

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München

**Einfluss von Tumor-assoziierten E-Cadherin-Mutationen
auf die Motilität und Signaltransduktion
von MDA-MB-435S Zellen**

Margit Roswitha Fuchs

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. sc. techn. ETH,
Dr. agr. habil. H.-R. Fries

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. med. Univ. H. K. Höfler
2. Univ.-Prof. Dr. med. vet.,
Dr. med. vet. habil. J. Bauer
3. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. W. Huber

Die Dissertation wurde am 16.01.2003 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 24.04.2003
angenommen.

meinen Eltern

A.	ZUSAMMENFASSUNG	1
B.	EINLEITUNG	3
1.	Bösartige Tumorerkrankungen: Entstehung und Metastasierung	3
1.1	Tumorentstehung	4
1.2	Invasion und Metastasierung	5
2.	Das Magenkarzinom	7
2.1	Mögliche Ursachen für die Entstehung eines Magenkarzinoms	8
2.1.1	Ernährungsbedingte Faktoren	8
2.1.2	Genetische Faktoren	8
2.1.3	<i>Helicobacter Pylori</i>	9
2.2	Klassifizierung des Magenkarzinoms	11
3.	Zelladhäsionsmoleküle	12
3.1	Cadherine und Catenine	13
3.2.1	Klassische Cadherine	13
3.2.2	E-Cadherin	14
3.2.3	E-Cadherin-Mutationen	16
3.2.4	β -Catenin	18
3.2	Integrine	20
4.	Signaltransduktion	21
4.1	Rezeptor-Tyrosinkinasen	23
4.2	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-Rezeptor)	25
4.3	Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase)	28
4.4	Akt/Proteinkinase B (PKB)	30
4.5	Mitogen aktivierte Protein (MAP)-Kinasen	31
4.6	Ras- und Rho-GTPasen	33
5.	Aufgabenstellung	38
C.	MATERIAL UND METHODEN	39
1.	Material	39
1.1	Geräte	39
1.2	Allgemeine Chemikalien	40
1.3	Enzyme	41
1.4	Kommerzielle Komplettsysteme	41
1.5	Allgemeine Puffer und Lösungen	41
1.6	Antikörper	42
1.7	Vektoren und Plasmide	43
1.8	Oligonukleotide	43
1.9	Reagenzien und Medien für eukaryotische Zellkultur	44
1.10	Medien und Antibiotika zur Anzucht von Bakterien	45
1.11	Verbrauchsmaterial	45

2. Methoden	46
2.1 Plasmidaufreinigung im kleinen Maßstab (Mini-Präp)	46
2.2 Plasmidaufreinigung nach Quiagen (Midi-Präp)	46
2.3 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	48
2.4 Herstellung von E-Cadherin-EGFP Konstrukten (EcadEGFP)	50
2.5 Sequenzierung der EcadEGFP-Konstrukte im ABI-377	56
2.6 Beschichtung von Kulturgefäßen mit Collagen I, Fibronectin, Vitronectin oder Poly-L-Lysin	57
2.7 Kultivierung eukaryotischer Zellen	57
2.8 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	58
2.9 Selektion mit DynaBeads	59
2.10 Isolierung genomischer DNA aus Zellen	60
2.11 Herstellung von Lysaten aus eukaryotischen Zellen	60
2.12 Proteinkonzentrationsbestimmung	61
2.13 Immunpräzipitation (IP)	61
2.14 Nicht-radioaktiver Rac-Assay	62
2.15 Radioaktiver PI3-Kinase Assay	63
2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	65
2.17 Western-Blot-Analysen	66
2.18 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)	66
2.19 Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern	67
2.20 Immunfluoreszenzfärbung mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin	68
2.21 Zell-MatrixAdhäsions-Assay	68
2.22 Migrationsexperimente in der Inkubationskammer	69
2.22.1 Zell-Motilitäts-Versuche mit unmarkierten MDA-MB-435S Zellen	69
2.22.2 Versuche mit EcadEGFP exprimierenden MDA-MB-435S Zellen	70
2.23 Mikroinjektion	71
2.24 Allgemeine molekularbiologische Methoden	72
2.25 Statistische Auswertungen	72
D. ERGEBNISSE	73
I. Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die Motilität von MDA-MB-435S Mammakarzinomzellen	73
1. Mutiertes E-Cadherin erhöht die Motilität von MDA-MB-435S Zellen im Vergleich zu <i>wt</i> -E-Cadherin	74
2. Rolle von EZM-Proteinen in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität	77
2.1 Einfluss von EZM-Proteinen auf die Adhäsion und Migration	77
2.2 Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die Expression Collagen-spezifischer Integrine	80
3. Rolle der EGF-Rezeptor-Signalkaskade in E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen	82
3.1 Die durch mutiertes E-Cadherin-vermittelte Motilität ist sensitiv gegenüber Inhibitoren des EGF-Rezeptors und der PI3-Kinase	84

3.2	EGF erhöht die Motilität <i>wt</i> -E-Cadherin exprimierender Zellen	85
II.	Räumliche und zeitliche Verteilung von mutiertem E-Cadherin während der Zellbewegung	86
1.	<i>In vitro</i> Lokalisation von mutiertem E-Cadherin und Zellmigration	87
1.1	Charakterisierung stabiler EcadEGFP-Klone	87
1.1.1	Sequenzanalysen des E-Cadherin Gens	87
1.1.2	Nachweis der EcadEGFP-Expression auf Proteinebene	88
1.1.3	Immunfluoreszenz-Analysen	90
1.2	<i>In vitro</i> Versuche in der Inkubationskammer	93
1.2.1	Lokalisation von <i>wt</i> - und mutiertem E-Cadherin und Motilitätsverhalten der Zellen in Vollmedium	94
1.2.2	Der EGF-Rezeptor Inhibitor Tyrphostin AG1478 führt zur Lokalisation von mutiertem E-Cadherin an den Zell-Zell-Kontaktstellen	98
1.2.3	EGF führt zur Lokalisation von <i>wt</i> -EcadEGFP in Lamellipodien	102
III.	Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die EGF-Rezeptor/PI3-Kinase-Signalkaskade	106
1.	Rolle des EGF-Rezeptors in der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität von MDA-MB-435S Zellen	107
1.1	Expressionsstatus der EGF-Rezeptors	107
1.2	Lokalisation des EGF-Rezeptors	109
2.	Stellung der PI3-Kinase in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Signaltransduktion	111
2.1	Expressionsstatus der PI3-Kinase	111
2.2	Aktivitätsstatus der PI3-Kinase	112
3.	Rolle der Akt/PKB in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität	113
3.1	<i>wt</i> -E-Cadherin erhöht die Aktivität der Akt/PKB in MDA-MB-435S Zellen im Vergleich zu mutiertem E-Cadherin	113
3.2	Einfluss verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Aktivierung der Akt/PKB	114
4.	Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die p44/p42 MAP-Kinase in MDA-MB-435S Zellen	116
4.1	Mutiertes E-Cadherin beeinflusst die Aktivität der p44/p42 MAP-Kinase nicht	116
4.2	Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die p44/p42 MAP-Kinase	117
5.	Einfluss von Rac1 auf die Motilität und Morphologie von MDA-MB-435S Zellen in Abhängigkeit vom E-Cadherin-Status	119
5.1	Expression und Lokalisation von Rac1	120
5.2	Aktivierungsstatus von Rac1	122
5.3	Einfluss von Rac1 auf das Aktin-Zytoskelett	122

6.	Die Expression der Matrix-Metalloproteinase MMP3 wird durch E-Cadherin auf Proteinebene beeinflusst	125
6.1	Expression der Matrix-Metalloproteinase MMP3 in MDA-MB-435S Zellen	126
E.	DISKUSSION	128
1.	Mutiertes E-Cadherin führt zu einer erhöhten Motilität von MDA-MB-435S Zellen im Vergleich zu <i>wt</i> -E-Cadherin	129
2.	Die durch mutiertes E-Cadherin erhöhte Motilität ist abhängig von extrazellulären Bedingungen	130
3.	Expressionsmuster Collagen-spezifischer Integrine	131
4.	Zentrale Stellung des EGF-Rezeptors in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität	133
4.1	Die durch mutiertes E-Cadherin erhöhte Motilität ist sensitiv gegenüber dem EGF-Rezeptor Inhibitor Tyrphostin AG1478	133
4.2	Expression und Lokalisation des EGF-Rezeptors sind vom E-Cadherin-Status abhängig	134
5.	Die durch mutiertes E-Cadherin erhöhte Motilität ist sensitiv gegenüber dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002	135
6.	Erhöhte Aktivierung der Akt/PKB in <i>wt</i> -E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen im Vergleich zu mutiertem E-Cadherin	136
7.	Untergeordnete Rolle der p44/p42 MAP-Kinase in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität	137
8.	Die Matrix-Metalloproteinase 3 wird vom E-Cadherin-Status beeinflusst	138
9.	Die Lokalisation und Aktivierung von Rac1 ist vom E-Cadherin-Status abhängig	139
10.	Räumliche und zeitliche E-Cadherin-Verteilung während der Zellbewegung	142
11.	Ausblick	146
F.	LITERATURVERZEICHNIS	147
G.	ABKÜRZUNGEN	166
H.	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	169
	DANKSAGUNG	171
	QUICK TIME MOVIES	173

A ZUSAMMENFASSUNG

Maligne Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, sich vom Primärtumor zu lösen und in entfernten Organen Metastasen zu bilden. Ein Verlust oder Mutationen im Kalzium-abhängigen, homophilen Zell-Adhäsionsmolekül E(epitheliales)-Cadherin korrelieren häufig mit der Metastasierung epithelialer Tumore. In unserem Institut wurden in ca. 50% diffuser Magenkarzinome Mutationen im E-Cadherin-Gen gefunden. Gehäuft traten *in frame* Deletionen von Exon 8 (*del8*) oder 9 (*del9*) sowie einmal eine Punktmutation im Exon 8 (D370A; *p8*) auf. Vorarbeiten haben gezeigt, dass in humanen, E-Cadherin-negativen MDA-MB-435S Zellen die Transfektion von mutiertem E-Cadherin zu einer reduzierten Adhäsion, erhöhten Motilität und veränderten Morphologie führt.

Basierend auf diesen Vorarbeiten war das Gesamtziel vorliegender Arbeit zu untersuchen, auf welche Weise mutiertes E-Cadherin in zelluläre Regulationsmechanismen eingreift und dadurch eine erhöhte Motilität verursacht. Die Untersuchung der Motilitäts-assoziierten EGF-Rezeptor/PI3-Kinase-Signalkaskade war in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung. Die Identifikation von Signalmolekülen, welche in die durch mutiertes E-Cadherin-vermittelte Motilitätserhöhung involviert sind, stellt eine wichtige Voraussetzung zur Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung maligner Tumoren mit E-Cadherin-Mutationen dar. Durch Applikation spezifischer Inhibitoren des EGF-Rezeptors (Tyrphostin AG1478) und der PI3-Kinase (LY294002) wurde erstmals nachgewiesen, dass beide Proteine in der durch mutiertes E-Cadherin erhöhten Motilität eine bedeutende Rolle spielen. Diese Daten wurden bereits in *Experimental Cell Research* (Fuchs *et al.*, 276, 129-141, 2002) publiziert. Als weitere wichtige Signalmoleküle wurden die Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP3) und die GTPase Rac1, welche in die Organisation des Aktin-Zytoskeletts und die Stabilisierung E-Cadherin-vermittelter Zelladhäsionen involviert ist, identifiziert. Mutiertes E-Cadherin veränderte die Expression von MMP3 und die Lokalisation von Rac1. Somit stellen diese Proteine ebenfalls therapeutisch interessante Zielmoleküle dar.

Weiterhin war es nach Herstellung EGFP-markierter E-Cadherin-Konstrukte und stabiler Expression der E-Cadherin-EGFP-Fusionsproteine in MDA-MB-435S Zellen erstmals möglich, die räumliche und zeitliche Verteilung von mutiertem

E-Cadherin in lebenden Zellen zu untersuchen. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass mutiertes E-Cadherin im Gegensatz zu nicht-mutiertem E-Cadherin vor allem nur kurzzeitige Zell-Zell-Kontakte ausbildet und somit die Motilität positiv beeinflusst. Die Applikation des Inhibitors Tyrphostin AG1478 sowie des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) veränderte nicht nur die Morphologie der Zellen, sondern auch die Lokalisation von EGFP-markiertem E-Cadherin.

Zur Durchführung der Motilitätsstudien wurde ein Testsystem in einer Temperatur- und CO₂-regulierten Inkubationskammer etabliert, das die Charakterisierung von Einzelzellen erlaubt. Dieser auf Zeitrafferaufnahmen basierende Motilitäts-Assay ermöglichte neben der Einzelzellanalyse die Untersuchung des Einflusses verschiedener Inhibitoren (Tyrphostin AG1478, LY294002 und MAP-Kinase-Kinase Inhibitor PD98059) und Aktivatoren (EGF) auf das Motilitätsverhalten.

Vorliegende Arbeit hat somit zur Identifikation von Signalmolekülen, welche eine wichtige Rolle in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilitätserhöhung spielen (EGF-Rezeptor, PI3-Kinase, Rac1 und MMP3), beigetragen. Die Inhibition dieser Proteine mit *small molecule drugs* stellt einen vielversprechenden Therapieansatz zur Behandlung maligner Tumoren mit E-Cadherin-Mutationen dar. Mit dem Motilitäts-Assay wurde ein Testsystem etabliert, das nicht nur für vorliegende Arbeit bedeutend war, sondern auch für weiterführende Studien zur Untersuchung des Einflusses solcher *small molecule drugs* auf maligne Zellen genutzt werden soll.

B EINLEITUNG

1. Bösartige Tumorerkrankungen: Entstehung und Metastasierung

Nach Angaben des statistischen Bundesamtes (Todesursachenstatistik, <http://www.destatis.de/presse/deutsch/pm2001/p3840092.htm>, Pressemitteilung vom 25.10.2001) waren in Deutschland im Jahr 2000 Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste (47,1%) und bösartige Neubildungen die zweithäufigste Todesursache (25,2%). Insgesamt erlagen mehr Männer (109700) dem Krebsleiden als Frauen (101300). Während bei Männern bösartige Erkrankungen der Verdauungsorgane (35000 Verstorbene) und der Atmungsorgane (30900 Verstorbene) die größte Bedeutung hatten, dominierten bei den verstorbenen Frauen bösartige Neubildungen der Verdauungsorgane (34800 Verstorbene) und der Brustdrüse (17900 Verstorbene). Die Anzahl der Menschen, die im Laufe ihres Lebens an Krebs erkranken, nimmt stetig zu.

Die biologische Klassifizierung der Tumore erfolgt in gutartige (benigne), teilweise bösartige (semimaligne) und bösartige (maligne) Tumore (Tab.1). Im weiteren werden epitheliale Tumore näher beschrieben. Benigne, gut differenzierte Tumore sind durch ein langsames Wachstum charakterisiert. Nachbarorgane werden durch den Tumor zwar verdrängt, aber nicht infiltriert. Benigne Tumore entstehen aus differenzierten Zellen und werden in der Regel von einer Bindegewebskapsel umgeben, welche sie gegen das umliegende Gewebe abgrenzt. Meist weisen benigne Tumore eine epitheliale Zellstruktur mit intakten Zell-Zell-Adhäsionen auf. Semimaligne, teilweise differenzierte Tumore bilden keine Metastasen, wirken aber sehr verdrängend. Infiltrierte Nachbarorgane werden von ihnen zerstört. Maligne Tumore zeichnen sich durch destruktives Wachstum aus. Sie entstehen aus undifferenzierten Zellen. Zellen maligner Tumore überschreiten Organgrenzen rasch und infiltrieren Nachbarorgane. Meist sind Zell-Zell-Kontakte defekt und die Tumorzellen sind durch einen eher fibroblastoiden Phänotyp gekennzeichnet. Ihre Zellkerne sind häufig vergrößert (hyperchromatisch) und von wenig Zytoplasma umgeben. Zum Teil liegen mehrere Kerne in einer Zelle vor. Die meisten bösartigen Neubildungen sind Karzinome. Das Wachstumsverhalten eines Tumors wird neben den Eigenschaften der Dignität von weiteren Faktoren wie der Organlokalisation,

individueller Tumorfaktoren und der genetischen Prädisposition des Patienten beeinflusst.

Tab. 1: Übersicht: benigne und maligne Tumore

Benigne Tumore	Lipome:	Tumore des Fettgewebes
	Fibrome:	Bindegewebs-Tumore
	Myome:	Tumore des Muskulatur
	Adenome:	Tumore des Drüsengewebes
Maligne Tumore	Karzinome:	Maligne Tumore epithelialer Herkunft
	Sarkome:	Maligne Tumore des Binde- und Stützgewebes
	Lymphome:	Maligne Tumore des Lymphatischen Gewebes
	Leukosen:	Maligne Tumore der blutbildenden Organe
	Liposarkome:	Fettgewebstumore
	Myosarkome:	Muskelzellsarkome
	Angiosarkome:	Malignome der Blutgefäße

1.1 Tumorentstehung

Laut Definition eines Tumors handelt es sich um eine gut- oder bösartige Geschwulst, welche durch Proliferation entstanden ist. Die Transformation einer normalen Zelle zu einer Tumorzelle ist das Resultat vieler zeitlich aufeinander folgender Einzelereignisse. Auslöser einer Tumorentstehung können die Einwirkung von kanzerogenen Stoffen sowie durch UV-Strahlen oder Viren hervorgerufene DNA-Mutationen sein. Ein Verlust bzw. Mutationen von Tumorsuppressor-Genen oder eine genetische Prädisposition spielen ebenso eine Rolle bei der Tumorigenese (Kinzler und Vogelstein, 1996). Eine einzelne Genmutation führt jedoch in der Regel noch nicht zur Entartung einer normalen Zelle. Bereits Ende der siebziger Jahre wurde von Knudson *et al.* (1979) die „*second-hit*“ Hypothese postuliert, welche besagt, dass ein zweites Ereignis notwendig ist, um die Transformation einer Zelle auszulösen.

1.2 Invasion und Metastasierung

Einzelne Zellen eines malignen Tumors besitzen die Fähigkeit, sich vom Primärtumor zu lösen und in entfernten Organen Sekundärtumore (Metastasen) zu bilden. Bei diesem Prozess müssen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionen gelöst und wieder neu gebildet werden. Die Metastasierung beginnt mit der Invasion, d.h. dem lokalen Eindringen von Randzellen des Primärtumors in das Bindegewebe, wobei die Adhäsion zu den Nachbarzellen verloren geht. Zu Beginn kommt es zu einer Anlagerung der Tumorzelle an Glykoproteine der extrazellulären Matrix (EZM), welche aus Kollagen Typ I, III, V und VI, Fibrin, Fibronectin und Proteoglykanen, wie Heparin und Heparinsulfat, zusammengesetzt ist. Diese Anlagerung wird in vielen Fällen von Integrin-Rezeptoren vermittelt. Manche Integrine erkennen dabei kurze Peptidsequenzen, wie z.B. das RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp; Ruoslahti, 1996).

Um in das umliegende Gewebe infiltrieren zu können, müssen maligne Zellen in der Lage sein, die Basalmembran, eine besondere Form der EZM (hauptsächlich bestehend aus Kollagen Typ IV und Glykoproteinen; von der Mark K, 1993) zu durchbrechen, d.h. diese ab- bzw. umzubauen (Basbaum *et al.*, 1996). Dies wird durch proteolytische Enzyme ermöglicht, welche entweder auf der Zelloberfläche der Tumorzelle lokalisiert sind oder dort freigesetzt werden (Aznavorian *et al.*, 1993). Maligne Zellen können aber auch körpereigene Zellen (Entzündungszellen) zur Sekretion lytischer Faktoren veranlassen. Stehen die Tumorzellen unmittelbar davor, die Basalmembran zu durchbrechen, nennt man den Tumor *Carcinoma in situ*, also ein sich im Übergang zur Malignität befindlicher Tumor.

Durch die entstandene Lücke in der Basalmembran dringt die Zelle aktiv in das benachbarte Gewebe ein. Invasive Zellen können auch zu Blut- oder Lymphbahnen gelangen, an denen sie sich entweder anlagern oder in das Gefäßsystem eindringen (Intravasation). Im Gefäßsystem aggregieren sie und setzen sich in den Kapillaren als so genannte Emboli fest. Mit dem Lymphstrom werden Einzelzellen des Emboli in die regionalen Lymphknoten transportiert und wachsen teilweise zu Lymphknotenmetastasen heran. Über den Blutstrom gelangen maligne Zellen in entfernte Organe. Durch erneute Anlagerung an die Gefäßwand treten die Zellen aus dem Blutsystem wieder aus (Extravasation) und dringen in andere Organe ein. Dort kommt es schließlich zur Bildung von Organmetastasen (Abb. 1).

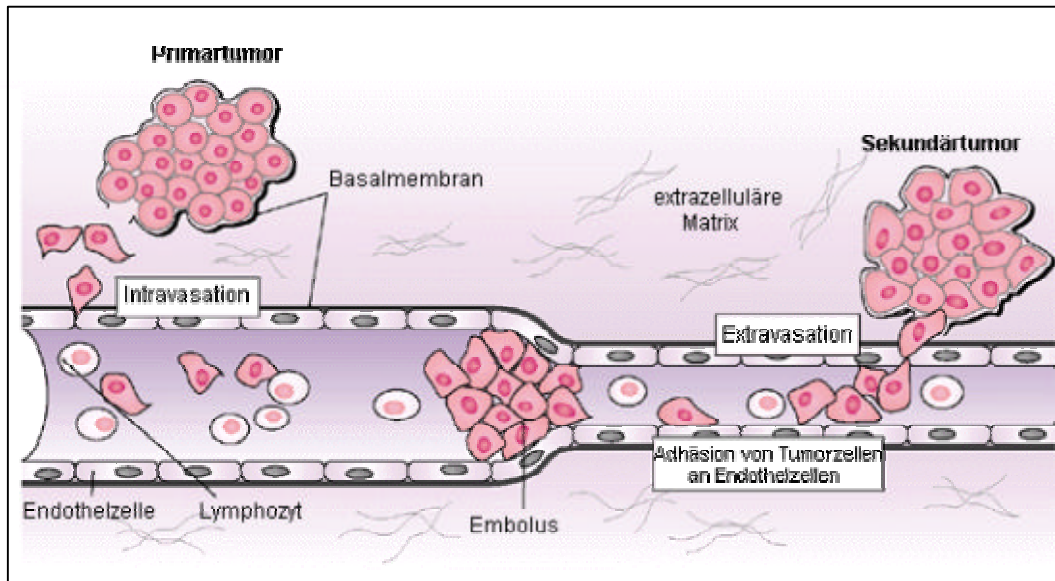


Abb. 1: Schematischer Ablauf der Metastasierung

Ein Weg vom Primär- zum Sekundärtumor wird ihm Text beschrieben (Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage, © Urban & Fischer Verlag, München 1999).

Es gibt vier verschiedene Klassen an Proteasen, denen im Rahmen der malignen Progression ein besonderer Stellenwert zukommt:

- **Matrix-Metalloproteinasen:** Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Membran-assoziierte Matrix-Metalloproteinasen
- **Serinproteasen:** Plasmogenaktivatoren uPA und tPA, Plasmin, Thrombin
- **Cysteinproteasen:** Kathepsine B, H, L, Caspasen
- **Aspartylproteasen:** Kathepsin D

Zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zählen über 20 Mitglieder EZM-degradierender Enzyme, welche durch unterschiedliche Substratspezifitäten charakterisiert sind. MMPs sind Zink-abhängige Enzymen und funktionieren extrazellulär bei neutralem pH-Wert. Sie spielen sowohl bei der normalen Entwicklung des Organismus als auch in pathologischen Prozessen wie der Tumorigenese eine wichtige Rolle (Coussens und Werb, 1996; Crawford und Matrisian, 1994). Als Folge ihrer proteolytischen Aktivität wird die Basalmembran lokal degradiert, was zu einer verminderten Adhäsion und verstärkten Migration maligner Zellen führt. Die Aktivität der MMPs kann durch den Einsatz von

Gewebeinhibitoren und synthetischen Inhibitoren gehemmt werden. Dies resultiert in einer Blockierung des Tumorwachstums und der Metastasierung (DeClerck *et al.*, 1992; Tsuchiya *et al.*, 1993). Zu den natürlichen Proteaseinhibitoren zählt die Familie der *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (TIMPs).

Tumorzellen erwerben meist im Laufe des Tumorwachstums die Fähigkeit zur Neoangiogenese, d.h. zur Ausbildung neuer Blutgefäße (Bouck *et al.*, 1996; Folkman, 1997; Hanahan and Folkman, 1996). Unter einem Durchmesser von 5 mm wird der Tumor oder die Metastase durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt (Dewhirst *et al.*, 2000; Folkman *et al.*, 1995; Hahnfeldt *et al.*, 1999; Strohmeier *et al.*, 1999). Wird diese Größe überschritten, müssen neue Blutgefäße aussprossen. In normalem Gewebe ist die Ausbildung neuer Blutgefäße einem strengen Regulationsmechanismus unterworfen, der im Tumorgewebe unkontrolliert abläuft.

2. Das Magenkarzinom

In Deutschland erkranken ca. 20000 Menschen an Magenkrebs, wobei Männer doppelt so häufig als Frauen betroffen sind. Beim Mann ist das Magenkarzinom der fünfthäufigste, bei der Frau der vierthäufigste bösartige Tumor (<http://www.krebs-kompass.de>, weiter Link zu Magenkrebs). Auch wenn die Zahl der Neuerkrankungen in den letzten beiden Jahrzehnten in Deutschland, wie auch in den anderen westlichen Industrieländern um ca. 50% sank, ist es wichtig, die malignen Zellen zu charakterisieren und somit neue Ansätze zur Therapieentwicklung zu schaffen. In Japan ist das Magenkarzinom immer noch die häufigste Krebsart. Die Entstehung von Magenkrebs ist altersabhängig und wird überwiegend ab dem 40. Lebensjahr diagnostiziert. Magenkrebs verursacht im Frühstadium häufig keine Beschwerden und wird daher oft erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Während im frühen Stadium die Behandlungsaussichten eher gut sind und die Fünf-Jahres-Überlebensrate mehr als 95% beträgt, können im späteren Stadium etwa die Hälfte der Magenkarzinome nicht mehr operativ behandelt werden. Die Lokalisation der Magenkarzinome betrifft zu 25% den Kardiabereich, zu 30% die kleine Kurvatur, zu 35% den Antrum- und Pylorusbereich, und zu 10% die anderen Bereiche des Magens. Bösartige Tumore des Magens entwickeln sich meist in der Schleimhaut

und gehen zu 95% vom Drüsengewebe aus (Adenokarzinome). Viel seltener sind Plattenepithelkarzinome, Lymphome und Sarkome zu beobachten (http://www.krebsinformation.de/ka_magenkrebs.html).

2.1 Mögliche Ursachen für die Entstehung eines Magenkarzinoms

2.1.1 Ernährungsbedingte Faktoren

Neben Rauchen und übermäßigem Alkoholgenuss zählen häufiger Verzehr stark gesalzener Lebensmittel, sowie gegrillter, geräucherter und gepökelter Speisen zu den Risikofaktoren, welche die Entstehung eines Magentumors begünstigen können. Die darin enthaltenen Nitrat- und Nitratsalze werden im Organismus in kanzerogene Nitrosamine umgewandelt. Nitrosamine können auch bei Verunreinigung der Nahrung mit Bakterien und Pilzen entstehen. Ein geringer Konsum von frischem Gemüse und Obst kann das Risikopotential erhöhen.

2.1.2 Genetische Faktoren

Die meisten Magenkarzinome entstehen sporadisch und nur 8-10% sind erblich bedingt (La-Vecchia *et al.*, 1992). Familiäre Anhäufungen zeigen in 12-25% ein dominantes Vererbungs-Muster (Goldgar *et al.*, 1994; Jones, 1964). Bei Verwandten ersten Grades (Eltern, Geschwister, Kinder) von Patienten mit Magenkarzinomen besteht oft ein erhöhtes Risiko (3,7fach), an einem Tumor zu erkranken (<http://www.medicine-worldwide.de/krankheiten/krebs/magenkrebs.html>). Die Entstehung von Magenkarzinomen tritt gelegentlich in Familien mit Keimbahnmutationen in den Genen *TP53* (Li Fraumeni Syndrom) (Varley *et al.*, 1995) und *BRCA2* (Thorlacius *et al.* 1996) auf. Keimbahnmutationen im Gen, welches für das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin (*CDH1*) kodiert, führen zu einer autosomal dominanten Prädisposition für ein Magenkarzinom, welches als vererbtes diffuses Magenkarzinom (HDGC) bezeichnet wird (Gayter *et al.*, 1998; Guilford *et al.*, 1999). Die Blutgruppe A begünstigt die Bildung von Magenkarzinomen (Aird and Bentall, 1953; Haenszel *et al.*, 1976). Der Verlust der Heterozygotie (LOH = *loss of*

heterozygosity) steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Tumorentstehung. Betroffen sind u.a. die Chromosomenregionen 3p, 4, 5q (30-40% auf dem *APC*-Locus) und 17p (über 60% auf dem *TP53*-Locus) (Rhyu *et al.*, 1994; Sano *et al.*, 1991). Signalwege, in welche der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), TGF_{α} , Interleukin-1a, Amphiregulin oder PDGF involviert sind, können durch Amplifikation oder Überexpression zugehöriger Rezeptoren oder Signalmoleküle einen Einfluss auf die Entstehung eines Magenkarzinoms haben (Tahara *et al.*, 1996).

2.1.3 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori ist ein ubiquitär vorkommender Mikroorganismus, mit welchem ca. die Hälfte der Weltbevölkerung infiziert ist. Eine kausale Verbindung zur Entstehung von Magengeschwüren, Magenkrebs und dem *Mucous Membrane Associated Lymphoid Tissue* (MALT) Lymphom ist gesichert (Go, 2002). Bei *Helicobacter pylori* handelt es sich um ein gram-negatives, gebogenes, stäbchen- oder spiralförmiges Bakterium (Warren and Marshall, 1983), welches mit seinen 3-7 Flagellen (Abb. 2) sehr beweglich ist. 1996 wurde der Organismus von der *World Health Organization* (WHO) als kanzerogen eingestuft (Parsonnet, 1996).

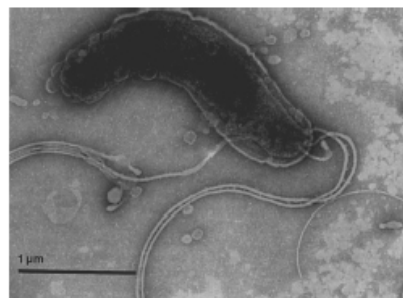


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Ansicht von *Helicobacter pylori*
(P. Malfertheiner *et al.* *Helicobacter pylori*, 1. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart (126))

Ca. 15-20% der mit dem Bakterium infizierten Personen werden vermutlich in ihrem Leben an einem Magengeschwür und <1% an Magenkrebs erkranken. Die genetische Prädisposition der infizierten Personen spielt dabei eine wichtige Rolle (Go, 2002). *Helicobacter pylori* weist nach dem heutigen Stand die größte genetische Heterogenität der untersuchten Bakterien auf. Zwei Genome wurden bis jetzt

sequenziert, welche in 6-7% der kodierenden Regionen nicht übereinstimmen. Diese Bereiche werden für die spezifische bakterielle Virulenz verantwortlich gemacht (Stein *et al.*, 2001). Um im sauren Milieu des Magens zu überleben, besitzt *Helicobacter pylori* eine spezielle Urease, wodurch ein neutraler Bereich im und um das Bakterium geschaffen wird. Im Gegensatz zu anderen Bakterien ist die Urease von *Helicobacter pylori* auch an der Zelloberfläche lokalisiert und dort enzymatisch aktiv (Phadnis *et al.*, 1996).

Das Cytotoxin-assoziierte Gen A (CagA) ist das am besten untersuchte Gen von *Helicobacter pylori*. Neben diesem Gen spielen aber auch bakterielle, Wirtsspezifische sowie Milieu-bedingte Faktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Magengeschwüren und -karzinomen. Das CagA Gen flankiert ein Ende der *cag pathogenicity island* (PAI) Region in *Helicobacter pylori*. Diese 40 kB große Region beinhaltet ca. 41 potentielle Gene, welche für das verstärkte Auftreten von Entzündungsreaktionen und die Sekretion von Virulenz-assoziierten Komponenten, wie der Interleukin-8 (IL-8) Induktion, der Rekrutierung von Neutrophilen, der Tyrosinphosphorylierung von CagA und der Proteinsekretion wichtig sind.

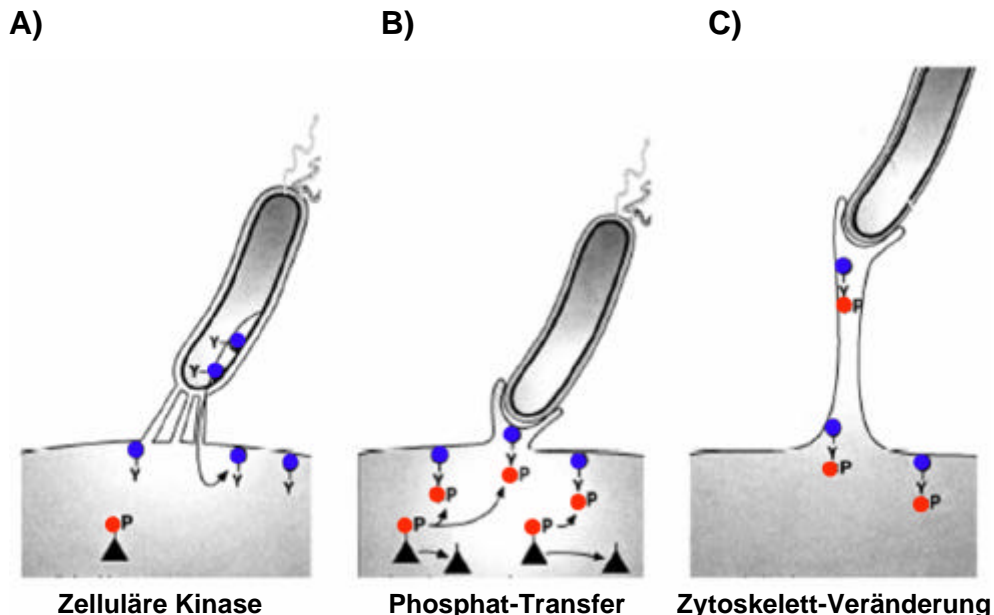


Abb. 3: Modell der CagA-Translokation und Auswirkungen auf die Zelle

A: CagA (schematisch als blauer Kreis mit einem Tyrosin (Y)-Rest dargestellt) wird in die Zelle über das so genannte Typ IV Sekretionssystem (dargestellt als Kanäle) in die Zelle transloziert. B: Tyrosin-Phosphorylierung von CagA (die Phosphatgruppen sind als roter Kreis mit einem P abgebildet) durch zelluläre Kinasen (schwarze Dreiecke). C: CagA vermittelt Signale, welche zur Ausbildung von Zellausläufern führen (modifiziert nach Stein *et al.*, 1999).

Nachdem sich das Bakterium an die Membran der Zelle angelagert hat, wird CagA über das Typ IV Sekretionssystem in die Zelle transloziert und dort von einer noch nicht identifizierten zellulären Kinase Tyrosin-phosphoryliert. Als Folge kommt es zur Ausbildung von zellulären Ausläufern, den Lamellipodien und Filopodien (Abb. 3) (Stein *et al.*, 1999; Go, 2000). Ein Ausschalten von CagA hat weder einen Einfluss auf die Aktivierung des *nuclear factor* (NF)- κ B oder der Mitogen aktivierten Protein (MAP)-Kinase, noch auf die Freisetzung von IL-8. Dies deutet darauf hin, dass zusätzlich ein unabhängiger bakterieller Faktor in die Wirtszelle injiziert wird (Abb. 4; Naito und Yoshikawa, 2002).

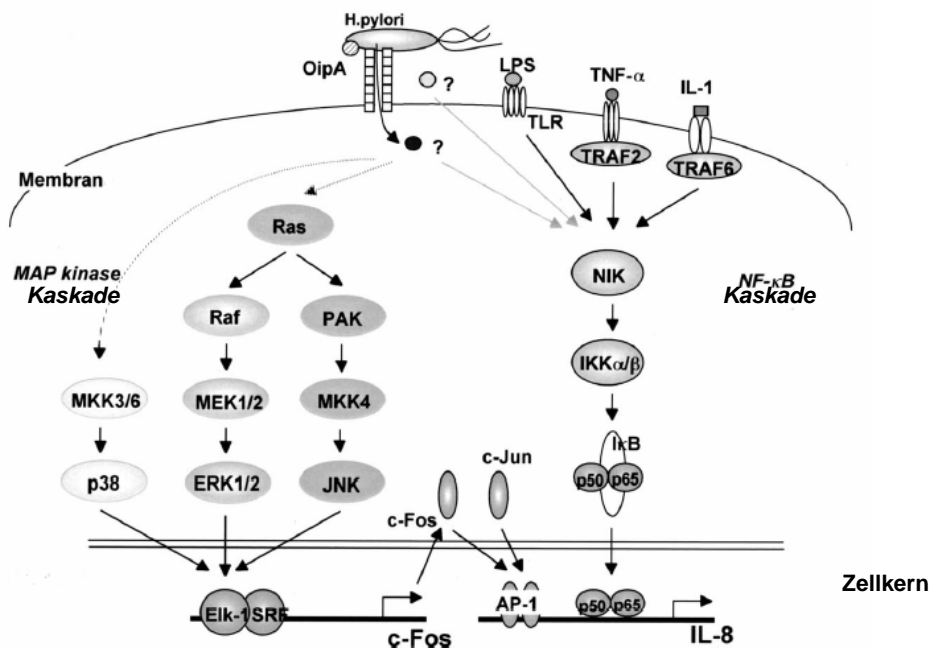


Abb. 4: Möglicher Einfluss von *Helicobacter pylori* auf die MAPK und NF κ B Signalkaskade

Intrazelluläre Signalkaskaden regulieren die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche an die Promotorregion des menschlichen IL-8 Gens binden. I κ B Kinase- α/β ; IL-1: Interleukin-1; LPS: Lipposaccharide; NIK: NF κ B-induzierend; OipA: *outer membrane protein*; TNF α : Tumornekrosefaktor α ; TRAF2/6: TNF Rezeptor assoziierter Faktor 2/6; TLR: *Toll-like* Rezeptor (modifiziert nach Naito und Yoshikawa, 2002).

2.2 Klassifizierung des Magenkarzinoms

Die Klassifikation des Magenkarzinoms nach Laurén gibt Auskunft über das Wachstumsmuster eines Tumors. Danach unterscheidet man drei verschiedene Arten von Tumoren:

- a) Intestinaler Typ: Überwiegend Drüsen
Auskleidende Zellen ähnlich intestinalen Zylinderzellen
Zellen wachsen polypös-expansiv in das Magenumen
Gute Prognose
- b) Diffuser Typ: Überwiegend gering kohäsive Zellen
Zellen wachsen undeutlich begrenzt und infiltrativ in
der Magenwand und penetrieren in Nachbarorgane
Die Prognose ist wegen des frühzeitig
einsetzenden Lymphknotenbefalls relativ schlecht
- c) Mischtyp: Zellen wachsen multizentrisch, d.h. sowohl in Richtung
des Magenumens als auch seitwärts in die Magenwand

Etwa 46% aller Magenkarzinome sind dem intestinalen und 36,5% dem diffusen Typ zuzurechnen. Der Mischtyp (15-20%) wird dem diffusen Typ zugeordnet. Während beim Intestinaltyp Ernährungsfaktoren für die Entstehung im Vordergrund stehen, werden für den diffusen Typ genetische Faktoren, z.B. E-Cadherin-Mutationen (Becker *et al.*, 1994) verantwortlich gemacht. Neben der Klassifikation nach Laurén gibt es weiterhin die histologische Einteilung in Differenzierungsgrade (*Grading*; G0-G4), eine Einteilung nach Borrmann, die nach makroskopischen Wachstumsformen hinsichtlich der 5-Jahres-Überlebensrate von prognostischer Bedeutung ist, und als vierte Klassifikation das TNM-Schema. Dieses dient der international standardisierten Stadieneinteilung (*Staging*) einer Tumorkrankheit. Kriterien des TNM-Schemas sind Größe bzw. Ausdehnung des Primärtumors (T0, T1-T4), Lymphknotenbefall (N0-N3), sowie Metastasenstatus (M0, M1).

3. Zelladhäsionsmoleküle

Migrierende Zellen durchlaufen vier verschiedene Phasen während ihrer Fortbewegung: Adhäsion, *Spreading*, Kontraktion und Zurückziehen des Zellkörpers, wobei die Retraktionsfaser abreißt (Holly *et al.*, 2000). In diesen Ablauf sind verschiedene Proteine, unter anderem Zelladhäsionsmoleküle, involviert. Die Zelladhäsionsmoleküle werden in vier Hauptgruppen eingeteilt: Cadherine, Integrine, die Immunglobulin-ähnliche Proteinfamilie und Selektine (Nollet *et al.*, 2000). Zwischen der Migration und der Adhäsion besteht eine sehr komplexe Verbindung,

d.h. die Rate der Zellmigration ist von der Adhäsion zur EZM abhängig (Paleck *et al.*, 1997). Dies bedeutet, dass die Migration weder bei einer zu starken noch zu schwachen Adhäsion zur EZM möglich ist.

3.1 Cadherine und Catenine

Cadherine sind für Vorgänge, welche die Zell-Zell-Adhäsion betreffen, von Bedeutung. Ihre Expression ist genau kontrolliert und jedes Gewebe oder Zelltyp ist durch ein bestimmtes Cadherin-Expressionsmuster charakterisiert. (Nollet *et al.*, 2000). Veränderungen in der Expression oder Funktionalität von Cadherinen wurden in menschlichen malignen Tumoren detektiert, welche in vielen Fällen zu einer verstärkten Invasion und Metastasierung der Krebszellen führte. Zur Gruppe der Cadherine gehören eine Vielzahl von Proteinen, die aufgrund ihrer Proteindomänen-Zusammensetzung, der Genomstruktur und der phylogenetischen Analyse in sechs Unterfamilien eingeteilt werden (Nollet *et al.*, 2000): die klassischen oder Typ I Cadherine, die atypischen oder Typ II Cadherine, Desmocolline, Desmogleine, Protocadherine und Flamingo Cadherine. Das zu den klassischen Cadherinen zählende E(epitheliale)-Cadherin ist z. Zt. am besten untersucht und wird als Prototyp Molekül für die gesamte Cadherin-Unterfamilie (Nollet *et al.*, 2000). angesehen.

3.2.1 Klassische Cadherine

Klassische Cadherine sind transmembrane Glycoproteine, die sich strukturell durch fünf extrazelluläre (EC1-5), einer Transmembran- sowie einer zytoplasmatischen Domäne auszeichnen (*reviewed in* Takeichi *et al.*, 1990). Die fünf extrazellulären Domänen sind in die Kalzium-abhängige, homophile Zell-Zell-Adhäsion der Cadherine involviert. Die ersten vier extrazellulären Domänen weisen alle im C-terminalen Bereich der Domänen je ein potentiell Kalziumbindungs-motiv auf (z.B. DXND oder LDRE). Das N-terminal lokalisierte Glutamat ist für die Kalziumbindung ebenso wichtig. Gebundenes Kalzium schützt Cadherine vor proteolytischem Abbau (Pertz *et al.*, 1999). Die zytoplasmatische Domäne ist hoch

konserviert (Hatta *et al.*, 1988) und interagiert mit Mitgliedern der Catenin-Familie, zu welcher α -, β - und γ -Catenin/Plakoglobin gehören (102 kDa, 97 kDa, 80 kDa). α -Catenin verbindet den Cadherin-Catenin-Komplex entweder direkt (Imamura *et al.*, 1999) oder indirekt über α -Aktinin mit den Komponenten des Aktin-Zytoskeletts (Knudsen *et al.*, 1995). Neben der Funktion im Adhäsionskomplex mit E-Cadherin spielt β -Catenin weiterhin eine wichtige Rolle bei der zellulären Signalübertragung (Barth *et al.*, 1997).

3.2.2 E-Cadherin

Epithelzellen zeichnen sich durch die Ausbildung zellulärer Monolayer aus, welche aus eng aneinander liegenden Zellen mit ausgeprägten interzellulären Kontakten bestehen. Die Kontakte zwischen den Epithelzellen beruhen auf zwei Arten von apikalen, interzellulären Verbindungen: den *Zonula Adherens Junctions* (Geiger and Ayalon, 1992), welche auf E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsion basieren, und den *Zonula Occludens Junctions* (Mitic and Anderson, 1998).

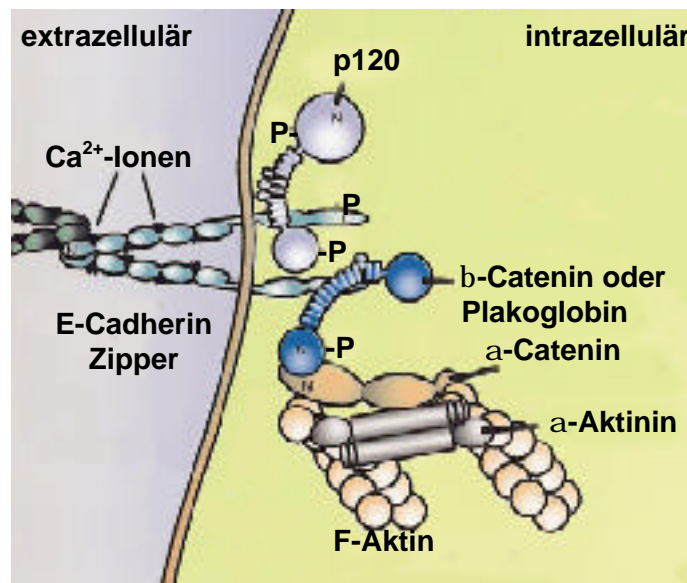


Abb. 5: E-Cadherin mit seinen intrazellulären Bindungspartnern, den Cateninen
 Erklärung siehe Text (modifiziert nach Nollet *et al.*, 1999).

E-Cadherin (Abb. 5) wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt und ist deshalb unter verschiedenen Synonymen beschrieben worden. Als L-CAM wurde es im Huhn (Gallin *et al.*, 1983), als Uvomorulin in der Maus (Schuh *et al.*, 1986), als cell-CAM 120/180 im Menschen (Damsky *et al.*, 1983) und als ARC-1 im Hund (Imhof *et al.*, 1983) beschrieben. Das humane E-Cadherin-Gen ist auf Chromosom 16q22.1 lokalisiert (Takeichi, 1990), die cDNA besteht aus 2652 Basenpaaren.

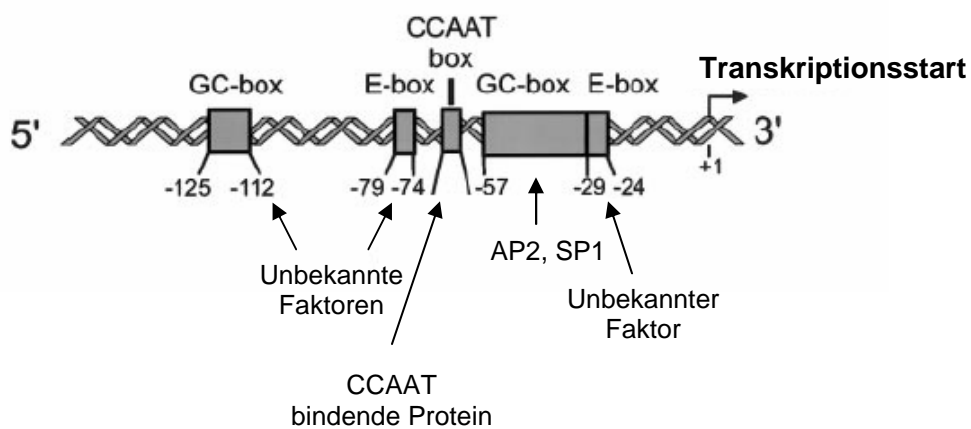


Abb. 6: Schematische Darstellung des E-Cadherin-Promotors

Die regulatorischen Elemente bestehen aus zwei GC-Boxen, zwei E-Boxen, der CCAAT-Box und dem Transkriptionsstart. Die E-Boxen sind wichtig für die epitheliale Spezifität und inhibieren den E-Cadherin-Promotor in undifferenzierten Zellen. Die CCAAT-Box und die GC-Box (-29 bis -57) üben einen positiven Effekt auf die Promotor-Aktivität aus (modifiziert nach Nollet *et al.*, 1999).

Die untranslatierte 5'-Region umfasst 1145 bp, die untranslatierte 3'-Region beginnt bei Position 2747 und endet bei Position 2781. Fünf positiv-regulatorische Elemente befinden sich im Promotorbereich (Abb. 6): zwei E-Boxen, das CCAAT-Element und zwei GC-Boxen (Behrens *et al.* 1991, Henning *et al.*, 1995; Nollet *et al.*, 1999). Das E-Cadherin-Protein ist je nach Spezies aus 723-748 Aminosäuren aufgebaut und hat ein Molekulargewicht von ca. 120 kDa. Es wird als Vorläufer-Protein synthetisiert und das reife Protein entsteht durch die Abspaltung der Vorläufer- sowie einer Signalsequenz. Die Halbwertszeit von E-Cadherin beträgt 5-10h (Jiang und Mansel, 2000), danach wird es internalisiert und entweder abgebaut, oder wieder an die Zelloberfläche zurück transportiert (Le *et al.*, 1999).

3.2.3 E-Cadherin-Mutationen

Ein Verlust oder Mutationen im E-Cadherin-Gen korrelieren oft mit der Metastasierung von epithelialen Tumoren (Birchmeier and Behrens, 1994). *In vivo* Mutationen im E-Cadherin-Gen wurden in diffusen Magenkarzinomen (Becker *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1994; Berx *et al.*, 1998), in gynäkologischen Tumoren (Ovar und Endometrium; Risinger *et al.*, 1994) und im lobulären Brustkarzinom (Berx *et al.*, 1995) entdeckt. Weiterhin wurden auch Keimbahnmutationen im E-Cadherin-Gen in Familien mit diffusen Magenkarzinomen beschrieben (Guilford *et al.*, 1998; Gayter *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1999; Keller *et al.*, 1999). Die Mutationen liegen über alle Exons verteilt, wobei eine Anhäufung der Mutationen in den Exons der extrazellulären Domäne zu finden ist (Abb.7).

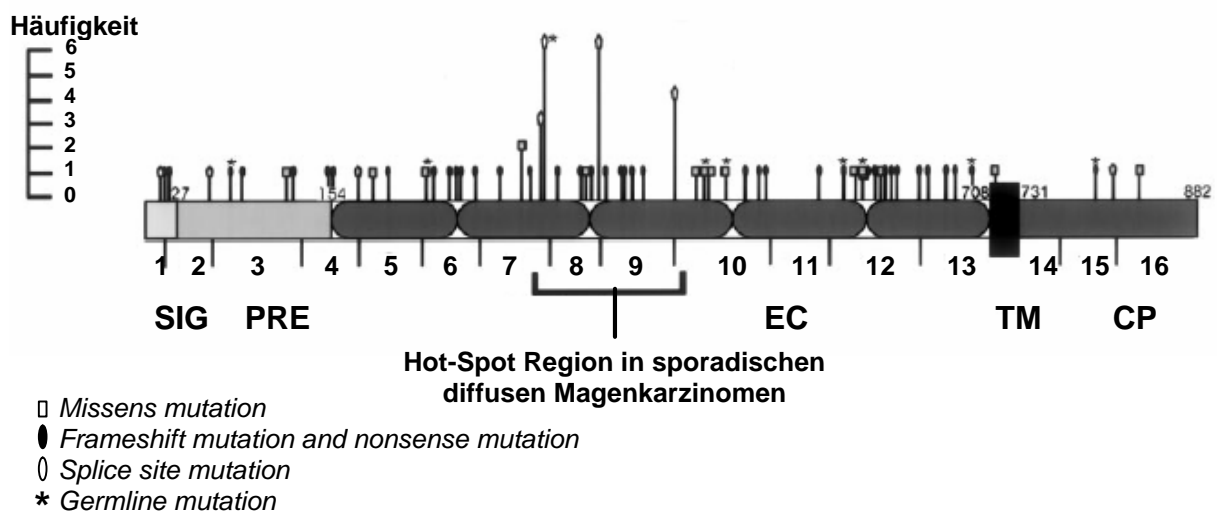


Abb. 7: Verteilung, Art und Häufigkeit von E-Cadherin-Mutationen in menschlichen Tumoren und Tumorzelllinien

E-Cadherin-Mutationen im sporadisch diffusen Magenkarzinom und sporadisch infiltrierendem Brustkarzinom. Abkürzungen der Proteindomänen: SIG: Signalpeptid; PRE: Vorläufersequenz; EC: extrazelluläre Domäne; TM: Transmembrandomäne; CP: zytoplasmatische Domäne. Die Zahlen 1-16 repräsentieren die Nummern der codierenden Exons. Die Skala links mit den Zahlen 0-6 gibt die Anzahl der vorkommenden Mutation wieder (modifiziert nach Nollet *et al.*, 1999).

Die im Magenkarzinom beschriebenen Mutationen treten vor allem in den Exons 8 und 9 auf, welche auch als "Hot Spot" Region bezeichnet werden. Bei den E-Cadherin-Mutationen, welche in lobulären Mammakarzinomen identifiziert wurden, handelt es sich um "missense" oder "Stop"-Mutationen (Berx *et al.*, 1995; Kanai *et al.*, 1994). In gynäkologischen Tumoren treten vor allem "missense"-Mutationen auf

(Risinger *et al.*, 1994). Somatische E-Cadherin-Mutationen sind im diffusen Magenkarzinom durch verstreute Tumorzellmorphologie charakterisiert (Becker *et al.*, 1994; Muta *et al.*, 1996; Tamura *et al.*, 1996). Becker und Koautoren zeigten 1994, dass in ca. 50% der von ihnen untersuchten diffusen Magenkarzinome gehäuft *in frame* Deletionen des Exons 8 (*del8*) oder des Exons 9 (*del9*) sowie einmal eine Punktmutation im Exon 8 (*p8*; D370A) im E-Cadherin-Gen vorlagen (Abb. 8). Der Einfluss dieser E-Cadherin-Mutationen auf die Zellmotilität und Signaltransduktion sollten in vorliegender Arbeit untersucht werden.

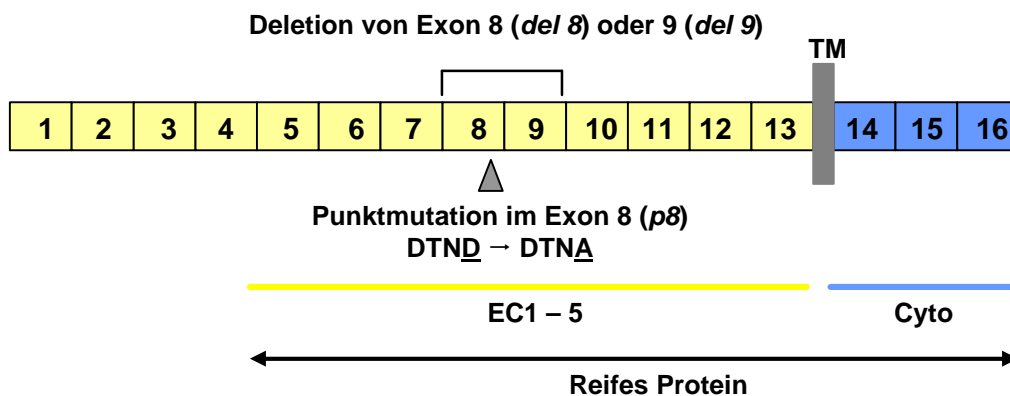


Abb. 8: Schematische Darstellung der Exonstruktur der E-Cadherin-cDNA mit häufigen Mutationen im diffusen Magenkarzinom

Die Punktmutation im Exon 8 führt zu einem Austausch von Aspartat (GAT, Position 370) durch Alanin (GCT), wodurch eine potentielle Kalziumbindungsstelle mutiert wird (DTND \rightleftharpoons DTNA). TM: Transmembran-Domäne. Cyto: Zytoplasmatische Domäne. EC1-5: Extrazelluläre Domäne 1-5.

E-Cadherin gehört zu den Tumorsuppressoren. E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion wirkt der Motilität und Invasion von Tumorzellen entgegen (Vleminckx *et al.*, 1991, Frixen *et al.*, 1991). Die E-Cadherin-Funktion als Tumorsuppressor ist oft in invasiven Tumoren herunter reguliert, z.B. durch eine Mutation verursacht (Birchmeier *et al.*, 1994; Hirohashi *et al.*, 1998). Perl und Koautoren spekulierten, dass ein Verlust des E-Cadherins die Ursache für die Transition von Adenomen zu Karzinomen ist (Perl *et al.*, 1998). Obwohl E-Cadherin keine intrinsische Enzymaktivität besitzt, nimmt es eine wichtige Stellung in der Signaltransduktion z.B. über die Ausbildung von Zellkontakten, die Transaktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-Rezeptor) oder durch verminderte Assoziation an β -Catenin ein (Pece *et al.*, 1999; Vleminckx *et al.*, 1999; Pece and Gutkind, 2000).

3.2.4 β -Catenin

β -Catenin ist ein 97 kDa großes Protein, das in der Zelle unterschiedliche Funktionen erfüllt. Während ein Membran-gebundener Pool in den *Adherens Junctions* mit Cadherinen und α -Catenin assoziiert ist (Yap *et al.*, 1997), akkumuliert β -Catenin nach Aktivierung des *Wnt/Wingless* Wachstumsfaktor-Signalweges im Zytoplasma und transloziert anschließend in den Zellkern. Wenn das *Wnt*-Signal fehlt, wird freie β -Catenin zum Abbau durch Phosphorylierung markiert. Dafür verantwortlich ist ein Multi-Protein-Komplex, der aus der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β), *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), Axin/Conductin, der Protein-Phosphatase 2A und *Disheveled* besteht (Behrens *et al.*, 1998; Polakis *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 1997). Sobald freies β -Catenin an den Komplex assoziiert, wird es von der GSK-3 β durch N-terminale Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten markiert und schließlich durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Aberle *et al.*, 1997; Orford *et al.*, 1997).

Liegen Mutationen im Bereich dieser Phosphorylierungsstellen vor, so wird β -Catenin stabilisiert und eine Degradation dadurch verhindert. In einigen Tumoren, welche Haut, Gehirn, Gebärmutter, Uterus und die Leber betreffen, wurden solche Mutationen entdeckt (Rubinfeld *et al.*, 1997; Fukuchi *et al.*, 1998; Palacios and Gamallo, 1998; Zurawel *et al.*, 1998). Mutationen im APC-Protein können ebenfalls zu einer Stabilisierung von freiem β -Catenin führen (Kobayashi *et al.*, 2000). In Anwesenheit eines *Wnt*-Signales wird die Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK-3 β blockiert. Dadurch kommt es zur Akkumulation von freiem, zytoplasmatischem β -Catenin, welches an Proteine der Lef/Tcf Familie binden, in den Kern translozieren und dort als transkriptioneller Co-Faktor agieren kann (Behrens *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996; Molenaar *et al.*, 1996). Dies induziert unter anderem die Transkription von Proto-Onkogenen wie *c-myc*, *Cyclin D1* und *WISP-1* (He *et al.*, 1998; Riese *et al.*, 1997; Shtutman *et al.*, 1999; Tetsu and McCormick, 1999; Van de Wetering *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2000).

β -Catenin ist in der Zelle in verschiedene Vorgänge involviert, weshalb es viele Proteine binden kann. Ein Großteil dieser Bindungspartner, wie Cadherin, APC, Axin, der EGF-Rezeptor und LEF/TCF assoziieren dabei an die zentralen Armadillo Wiederholungsregionen von β -Catenin (Behrens *et al.*, 1996, 1998; Hülsken *et al.*,

1994; Ikeda *et al.*, 1998; Rubinfeld *et al.*, 1995; Van de Wetering *et al.*, 1997), welche aus 12 Wiederholungen eines ca. 42 Aminosäuren langen Sequenzmotivs bestehen (Peifer *et al.*, 1994; Abb. 9). Diese Bindungspartner zeigen zwar keine signifikanten Ähnlichkeiten, tragen aber alle eine kurze Aminosäuresequenz (Ser-Ser-Leu), welche vermutlich ein Teil der β -Catenin-Bindungsstelle ist

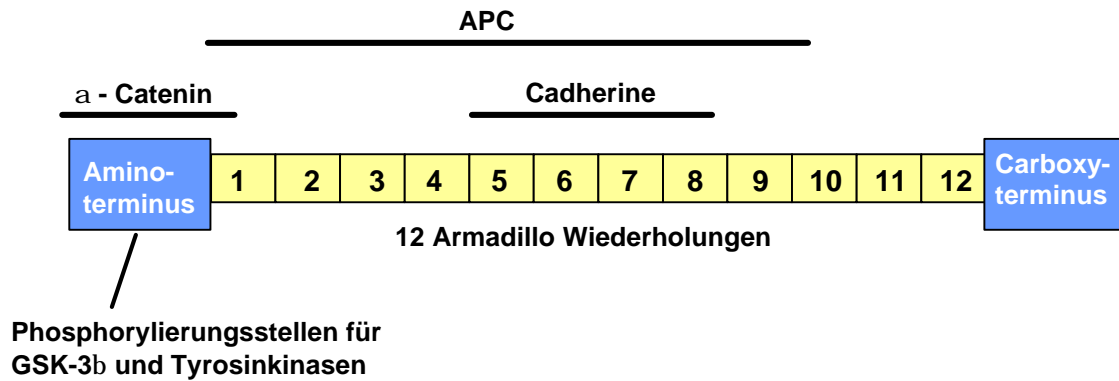


Abb. 9: Schematische Darstellung ausgewählter Bindungsstellen an β -Catenin
 Schematisch dargestellt sind die Bereiche innerhalb des β -Catenin-Proteins, an denen *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), α -Catenin und Cadherine binden können, sowie die Phosphorylierungsstellen für Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) und Tyrosinkinasen. Nummeriert sind die 12 Armadillo Wiederholungen von N-terminal nach C-terminal.

Wichtig für die Kontrolle des Zellwachstums ist die Assoziation von β -Catenin an den EGF-Rezeptor und die Phosphorylierung durch diesen (Hoschuetzky *et al.*, 1994). Eine Stimulation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor EGF resultiert in der Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin und einer Bindung an den EGF-Rezeptor. Diese Assoziation ist direkt und von der Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors abhängig. Weiterhin wurden Komplexbildungen von β -Catenin mit der Tyrosin-Phosphatase LAR sowie PTP κ beschrieben (Aicher *et al.*, 1997). Tao und Kollegen (1996) identifizierten die Bindung von β -Catenin mit dem Brustkrebs-Antigen DF3/MUC1. Dieses Mucin-ähnliche Glykoprotein ist im humanen Mammakarzinom überexprimiert und bindet an β -Catenin, wodurch die Interaktion mit E-Cadherin blockiert wird. Eine wichtige Bedeutung für die Signaltransduktion hat die kürzlich beschriebene Bindung von β -Catenin an die regulatorische p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (Pece *et al.*, 1999; Woodfield *et al.*, 2001). Diese Interaktion zwischen β -Catenin und der p85 Untereinheit ist nicht von der Tyrosin-Phosphorylierung abhängig, kann aber dadurch modifiziert werden (Müller *et al.*, 1999).

3.2 Integrine

Die Integrin-Familie besteht aus über 23 Glycoproteinen (Akiyama, 1996), welche sowohl mit Liganden auf anderen Zellen, als auch mit der extrazellulären Matrix interagieren können. Integrine sind nicht-kovalent gebundene, heterodimere Komplexe, welche aus einer α - (120-180 kDa) und einer β -Untereinheit (90-110 kDa) zusammengesetzt sind (Ross and Borg, 2001). Mittlerweile sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt (Parise *et al.*, 2000). Jede dieser Untereinheiten stellt ein Glykoprotein mit einer großen extrazellulären Domäne und einer Transmembrandomäne dar. Charakteristisch für die meisten Integrine ist eine kleine zytoplasmatische Domäne, die aus 40 bis 60 Aminosäuren besteht. Die Integrin-Untereinheiten sind mit dem Zytoskelett über eine Vielzahl von Proteinen, wie z.B. α -Aktinin, Talin, Vinculin und Tensin verbunden. Die β 4-Untereinheit stellt in ihrer Größe eine Ausnahme dar, da sie aus über 1000 Aminosäuren aufgebaut ist und stärker mit dem Intermediärfilament als mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert.

Die $\alpha\beta$ -Paarung legt die Spezifität der Ligandenbindung fest. Während einige Integrine, wie z.B. der Fibronectin-Rezeptor $\alpha5\beta1$, nur einen bestimmten Liganden erkennen können, sind die meisten Integrine in der Lage, mehrere Liganden zu binden (Abb. 10). Dabei assoziieren die Liganden entweder über verschiedene Domänen an den Rezeptor (z.B. bei $\alpha5\beta1$ -Integrin und $\alpha4\beta1$ -Integrin) oder sie benutzen die gleiche Bindungsstelle im Rezeptor (z.B. bei $\alpha5\beta1$ -Integrin und $\alpha3\beta1$ -Integrin). Nach erfolgter Ligandenbindung werden Signale indirekt über den Integrinrezeptor in die Zelle weitergeleitet und zelluläre Antworten ausgelöst. Man bezeichnet diesen Vorgang als *outside in* Signalübertragung. Eine Vielzahl von Signalmolekülen, wie z.B. die klassische Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalkaskade, die Familie der kleinen Rho-GTPasen (Rho, Rac und Cdc42), die PI3-Kinase, sowie zytoplasmatische Tyrosinkinasen, wie die *focal adhesion kinase* (FAK), sind in diese Signaltransduktion involviert. Neben der *outside in* Signalweiterleitung gibt es weiterhin die *inside out* Signalübertragung. Dabei reguliert die Zelle den Affinitätsstatus ihrer Integrinrezeptoren. Intrazelluläre Signalübertragungen können zu einer Konformationsänderung der zytoplasmatischen Integrin-Domäne führen. Die Auswirkungen auf die extrazelluläre Domäne des Rezeptors können z.B. zur Assoziation von anderen Proteinen führen.

einzelner Signalwege bereits gravierende Auswirkungen, wie z.B. die Entstehung von Tumoren, haben.

Die Stimulation einer Zelle über eine Rezeptor-Ligand-Bindung induziert eine intrazelluläre Signalweiterleitung. Die spezifische Bindung eines Liganden an einen Rezeptor wird durch eine definierte Struktur, der Ligandenbindungsstelle, auf der Rezeptoroberfläche determiniert. Die Interaktion zwischen einem Signalmolekül und dem zugehörigen Rezeptor löst intrazelluläre Antworten aus und modifiziert die Zellaktivitäten. Eine Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor kann entweder auf der Oberfläche der Zielzelle oder im Zellinneren erfolgen. Steroidhormone diffundieren z.B. aufgrund ihres lipophilen Charakters durch die Zellmembran und werden von intrazellulären Rezeptoren gebunden. Die dabei entstehenden Hormon-Rezeptor-Komplexe translozieren in den Zellkern und regulieren durch Bindung an spezifische DNA-Abschnitte direkt die Genexpression. Im Gegensatz zu Steroidhormonen können hydrophile Signalmoleküle, wie z.B. Wachstumsfaktoren, nicht ungehindert durch die Zellmembran diffundieren und werden daher von integralen Membranproteinen, welche eine extrazellulär lokalisierte Ligandenbindungsstelle besitzen, gebunden. Die intrazelluläre Signalweiterleitung des aktivierten Rezeptors erfolgt anschließend entweder indirekt durch die Bildung von sekundären Botenstoffen (z.B. cAMP) oder direkt durch die Veränderung von Proteinkinase-Aktivitäten.

Membran-ständige Rezeptoren lassen sich in vier Klassen einteilen:

- Ionenkanalrezeptoren
- Rezeptoren, die an heterodimere G-Proteine gekoppelt sind
- Rezeptoren ohne eigene katalytische Aktivität, an die jedoch zytosolische Tyrosin-spezifische Proteinkinasen gebunden werden können
- Rezeptoren mit eigenständiger Enzymaktivität (Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie der EGF-Rezeptor)

In letzter Zeit wurde E-Cadherin des öfteren mit *der outside in* Signalübertragung in Verbindung gebracht. So wurden eine E-Cadherin vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase über den EGF-Rezeptor (Pece und Gutkind, 2000) und eine Aktivierung des PI3-Kinase / Akt/PKB-Signalweges durch E-Cadherin-vermittelte

Bildung von *Adherens Junctions* beschrieben (Pece *et al.*, 1999). Deshalb ist die Analyse Motilitäts-relevanter Signalwege und -moleküle in Abhängigkeit vom E-Cadherin-Mutationsstatus ein wichtiger Aspekt vorliegender Arbeit.

4.1 Rezeptor-Tyrosinkinasen

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) sind wichtige Regulatoren von intrazellulären Kontrollmechanismen hinsichtlich des Zellwachstums, der Proliferation, des Zellüberlebens und des Metabolismus. Bis heute wurden ca. 20 verschiedene RTK Familien identifiziert, welche durch eine ähnliche molekulare Topologie charakterisiert sind: eine extrazelluläre Bindedomäne für Polypeptid-Wachstumsfaktoren, eine Transmembran-Region und eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne (Ullrich und Schlessinger, 1990). In vielen RTKs ist die extrazellulär lokalisierte Liganden-Bindedomäne durch N- und/oder O-glykosidisch gebundene Oligosaccharideinheiten modifiziert. Die Interaktion des Liganden mit der RTK induziert bzw. stabilisiert die Rezeptordimerisierung, wodurch ein Anstieg der RTK Kinaseaktivität induziert wird (Zwick *et al.*, 2002). Innerhalb der RTKs ist die intrazelluläre katalytische Domäne am höchsten konserviert. Diese Domäne trägt eine ATP-Bindestelle, welche die Rezeptor-Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosinreste katalysiert. Über diese Tyrosinreste können weitere Proteine binden, welche eine Src-homologe 2 (SH2)- und Phosphotyrosinbinde (PTB)-Domäne tragen. Zu diesen Proteinen zählen z.B. Shc, Grb2, Src, Cbl und die Phospholipase C γ (Zwick *et al.*, 2002). Diese Proteine sind wiederum in der Lage, weitere Effektormoleküle, die durch SH2, SH3, PTB und Pleckstrin Homologe (PH)-Domänen charakterisiert sind, an den aktivierten Rezeptor zu rekrutieren, wodurch Signalkomplexe entstehen und die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden ausgelöst wird. Zu den wichtigsten *downstream* Signalkaskaden, welche über eine RTK-Aktivierung induziert werden, gehören die *extracellular signal-regulated Kinase* (ERK)/MAP-Kinase-Kaskade, die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase)/Akt/PKB-Kaskade und der JAK/STAT-Signalweg (Abb. 11). Die Aktivierung von RTKs führt entweder zur Aktivierung oder Repression von verschiedenen Genen, d.h. eine biologische Antwort auf ein erhaltenes Signal wird ausgelöst.

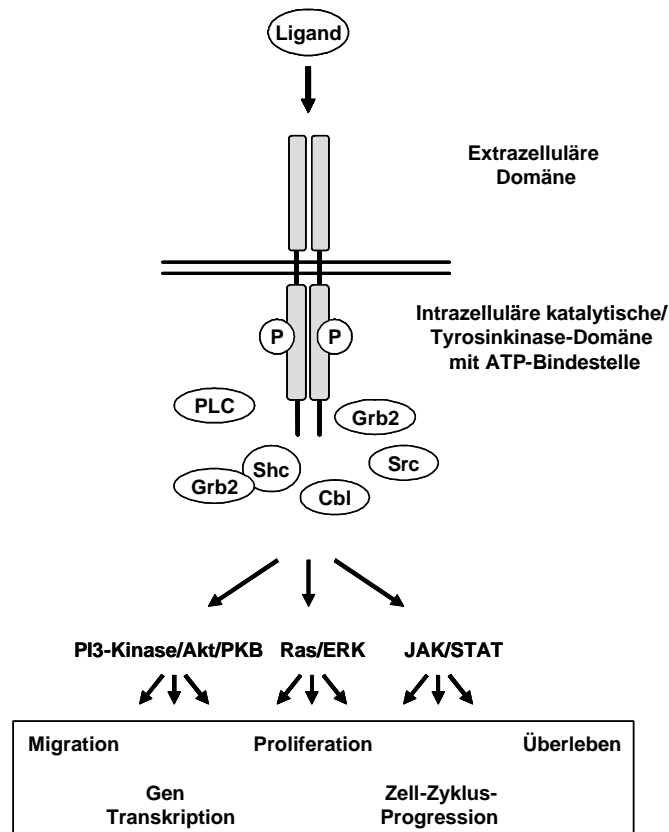


Abb. 11: Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalkaskaden

Erklärung siehe Text. STAT: *signal transducer and activator of transcription* (modifiziert nach Zwick *et al.*, 2002).

In nicht-transformierten Zellen werden sowohl die Aktivierung der RTKs als auch die dadurch vermittelten intrazellulären Signalkaskaden genau kontrolliert. Eine Fehlregulation dieser RTK-Signalwege, verursacht entweder durch eine autokrine-parakrine Wachstumsfaktorschleife und/oder genetische Veränderungen (z.B. erhöhte Genamplifikation), resultiert in einer fehlregulierten Tyrosinkinase-Aktivität (Zwick *et al.*, 2002). Eine Überexpression der RTK kann auf der Zelloberfläche zu einer Rezeptordimerisierung in Abwesenheit eines aktivierenden Liganden führen (Zwick *et al.*, 2002). Die Folge dieser Veränderungen ist eine verstärkte oder konstitutiv-aktive Signalweiterleitung, wodurch eine maligne Transformation induziert wird. Deshalb werden RTK-Veränderungen oft im Zusammenhang mit menschlichen Tumoren detektiert.

4.2 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-Rezeptor)

Die Familie der Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGF-Rezeptoren) besteht aus vier Untergruppen, an welche verschiedene Liganden binden (Tab. 2).

Tab. 2: Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit Liganden

Rezeptor-Bezeichnung	Liganden
• HER1 (erbB1/EGFR)	EGF, TGF α , Amphiregulin Epiregulin, Heparin-bindendes EGF (HB-EGF), Betacellulin
• HER2 (erbB2/c-neu)	unbekannt
• HER3 (erbB3)	Neuregulin
• HER4 (erbB4)	Neuregulin, Heparin-bindendes EGF, Betacellulin

Nach Bindung des Wachstumsfaktors an den Rezeptor kommt es zur Homo- bzw. Heterodimerisierung zwischen den Mitgliedern der vier EGF-Rezeptor-Untergruppen. Durch die Heterodimerisierung entsteht eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten der Rezeptoren untereinander, welche in die Regulation der Zelldifferenzierung, -migration und -proliferation, sowie die DNA-Synthese und Expression von Proto-Onkogenen wie *fos* und *jun* involviert sind (Voldborg *et al.*, 1997).

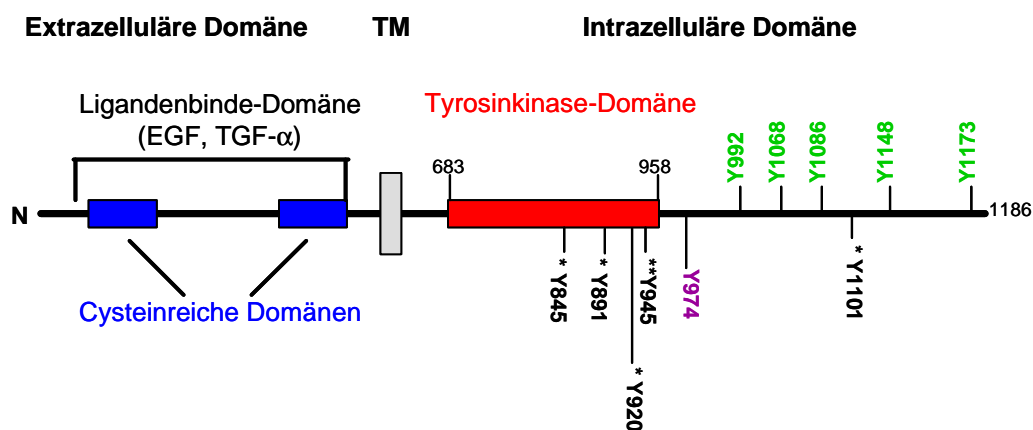


Abb. 12: Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors

Dargestellt ist die extrazelluläre Domäne mit der Ligandenbinde-Domäne und den Cysteinreichen Domänen (blau), die Transmembrandomäne (TM), sowie die intrazelluläre Domäne mit der Tyrosinkinase Domäne (rot). N: Amino-Terminus. Die Zahlen repräsentieren die Stelle im Gen. Autophosphorylierungsstellen sind in grün dargestellt, durch die c-Src Kinase phosphorylierte Tyrosinreste sind mit einem einzelnen Stern markiert. Die c-Src Kinase phosphoryliert in murinen C3H10T1/2 Fibroblasten Y845 und 1101, in humanen MCF7 Brustkrebszellen Y891 und 920 und in humanen A431 Karzinomzellen und in humanen MDA-MB-468 Brustkrebszellen Y845. Die potentielle Autophosphorylierungsstelle Y954 ist mit zwei Sternen gekennzeichnet. Der Clathrin Adaptorbindende Tyrosinrest Y974 ist lilafarbig markiert (modifiziert nach Bishayee, 2000).

Der EGF-Rezeptor (Abb. 12) nimmt eine wichtige Stellung in der Tumorigenese ein und ist häufig in soliden Tumoren überexprimiert (Tab. 3). Für die Überexpression des EGF-Rezeptors ist in den meisten Fällen eine Genamplifikation mit teilweise bis zu 60 Kopien pro Zelle verantwortlich (Libermann et al., 1985). Häufig sind aber auch genetische Veränderungen die Ursache einer erhöhten Aktivierung, wie Deletionen oder Mutationen innerhalb der extrazellulären Domäne oder Veränderungen der katalytischen Domäne, insbesondere der ATP-Bindestelle (Zwick et al., 2002). Ein wichtiger Mechanismus der konstitutiven Aktivierung des EGF-Rezeptors ist die so genannte autokrine-parakrine Wachstumsfaktorschleife, d.h. Ligand und Rezeptor stimulieren sich gegenseitig.

Tab. 3: Expression des EGF-Rezeptors in einigen ausgewählten soliden Tumoren

Lokalisation des Tumors	Prozentsatz von Tumoren, die den EGF-Rezeptor exprimieren/überexprimieren	
Kopf- und Hals	80 -100%	Salomon et al. (1995); Grandis et al. (1996)
Darm	25 - 77%	Salomon et al. (1995); Messa et al. (1998)
Prostata	40 – 80%	Herbst und Langer (2002)
Brust	14 – 91%	Klijn et al. (1992); Beckmann et al. (1996), Walker und Dearing (1999)
Magen	4 – 33%	Salomon et al. (1995); Yasui et al. (1988)

Kürzlich wurde eine Interaktion des EGF-Rezeptors mit dem E-Cadherin/Catenin-Komplex beschrieben. Diese Verbindung wird durch β -Catenin, welches nach EGF-Zugabe Tyrosin-phosphoryliert wurde, vermittelt (Hoschuetzky et al., 1994; Jawhari et al., 1999; Takahashi et al., 1997). Müller und Koautoren (1999) konnten weiterhin zeigen, dass eine EGF-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin die Motilität epithelialer Zellen erhöht. Demzufolge könnte im Magenkarzinom ein *Rezeptor-Crosstalk* zwischen dem EGF-Rezeptor und dem Komplex, der aus mutiertem E-Cadherin und β -Catenin besteht, eine erhöhte Zellmotilität induzieren.

Untersuchungen mit chimären Rezeptoren haben gezeigt, dass der Ligand-gebundene EGF-Rezeptor schnell internalisiert und degradiert wird. Dies ist bei den anderen Untergruppen dieser Familie nicht der Fall (Baulida et al., 1996). Nach erfolgter Internalisierung wird der Ligand-Rezeptor-Komplex zu den frühen

Endosomen transportiert. Dort kommt es zur Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes und der Rezeptor wird entweder über das Recycling-Endosom wieder an die Membran zurücktransportiert oder nach mehreren Stufen im Lysosom degradiert. Spezifische Charakteristika der Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind entscheidend, welcher der beiden Wege nach der Internalisierung durchlaufen wird. Der EGF-Rezeptor rekrutiert die Ubiquitin-Proteinligase c-Cbl, welche den EGF-Rezeptor polyubiquitiniert und somit seine lysosomale Degradierung bestimmt (Joazeiro *et al.*, 1999; Levkowitz *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu ist z.B. die C-terminale Domäne von HER3 für das Rezeptor-Recycling zur Zellmembran verantwortlich (Waterman *et al.*, 1999). Für die lysosomale Determination des EGF-Rezeptors sind weiterhin C-terminale Reste im Rezeptor wichtig (Kornilova *et al.*, 1996). Modifikationen im EGF-Rezeptor, wie z.B. eine durch die Proteinkinase C (PKC)-vermittelte Threonin-Phosphorylierung, können den Rezeptor vor der Polyubiquitinierung schützen und ins Recycling-Endosom dirigieren (Abb. 13, Bao *et al.*, 2000). Zytoplasmatische Effektorproteine, welche an die phosphorylierten Tyrosinreste des EGF-Rezeptors durch SH2- oder PTB-Domänen binden, können entweder Adaptorproteine oder Enzyme sein.

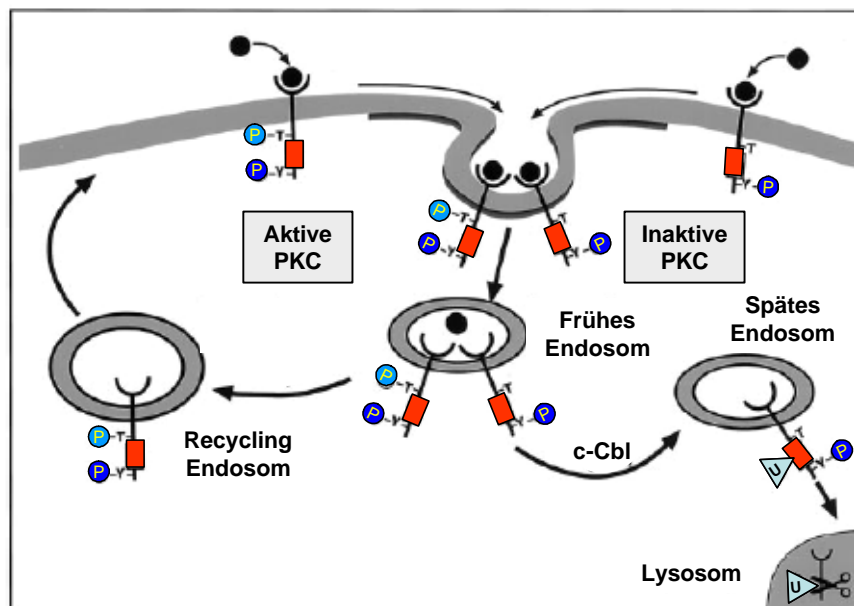


Abb. 13: EGF-Rezeptor Internalisierung: Rolle der Proteinkinase C (PKC)
 Erklärung siehe Text. P: Phosphat; schwarzer Kreis: EGF; U: Ubiquitin (modifiziert nach Bao *et al.*, 2000).

Der EGF-Rezeptor ist des Weiteren in die Zelladhäsion involviert. So interagiert er z.B. mit Integrinen, welche Zell-Zell-Adhäsion, Zell-Matrix-Adhäsion und intrazelluläre Signalübertragung vermitteln (Miyamoto *et al.*, 1996; Schneller *et al.*, 1997). Eine Interaktion zwischen der FAK und dem EGF-Rezeptor konnte von Sieg und Kollegen (Sieg *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. Diese Bindung führte zur Induktion einer EGF-Rezeptor-vermittelten, von der intrinsischen Kinaseaktivität unabhängigen Zellmigration. Über den EGF-Rezeptor wird eine Vielzahl von Signalkaskaden aktiviert, darunter die PI3-Kinase-Kaskade und die MAP-Kinase-Kaskade.

4.3 Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase)

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) ist eine Lipid-Kinase und spielt eine Rolle in Signalkaskaden, welche Zellwachstum, Apoptose-Regulation und Motilität betreffen. Die Aktivierung der PI3-Kinase wird über verschiedene Signalwege induziert. So kann sie entweder über aktivierte Rezeptoren (Kapeller *et al.*, 1993) oder eine direkte Interaktion mit der GTPase Ras aktiviert werden (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994; Rodriguez-Viciano *et al.*, 1996). Nachdem die PI3-Kinase an die Zellmembran rekrutiert und aktiviert worden ist, werden Inositol-Lipide an der D-3 Position des Inositolringes phosphoryliert, was zur Bildung verschiedener Phosphatidylinositole führt. Die Phosphatidylinositole rekrutieren anschließend weitere Effektorproteine mit einer PH-Domäne an die Membran und aktivieren diese dort. Zu den Effektorproteinen der PI3-Kinase zählen unter anderem Proteinkinasen (Akt/PKB, PDK1 und PDK2), Nucleotid-Austausch-Faktoren (Tiam1, Vav und Sos1), GTPase aktivierende Faktoren, der ADP-Ribosylierungsfaktor6 (ARF6), Phospholipasen, sowie Protein-Tyrosin-Kinasen der Bruton's Tyrosin Kinase und die Tec Familie (Cantley, 2002; Magun *et al.* 1996; Shibasaki *et al.*, 1994).

Hinsichtlich der Primärstruktur, des Regulationsmechanismus und der *in vitro* Substratspezifität werden PI3-Kinasen in drei Unterklassen eingeteilt (Roymans and Siegers, 2001): Klasse I, II und III. In vorliegender Arbeit wurden die Kinasen der Klasse III untersucht. Diese Klasse der Kinasen zeichnet sich dadurch aus, dass sie Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3) generiert und nur aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen (p85) Untereinheit als Heterodimer

aufgebaut ist (Fruman *et al.*, 1998; Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Abb. 14). Eine Stimulation der Zellen mit EGF induziert die Bildung von PIP3 aus PIP2 durch die PI3-Kinase. Die EGF-induzierte Aktivierung der PI3-Kinase über den EGF-Rezeptor ist, verglichen mit der Aktivierung über andere Rezeptor-Tyrosinkinasen, aufgrund einer fehlenden SH2-Domäne-Erkennungssequenz (YXXM) im EGF-Rezeptor relativ schwach. Im Gegensatz zum EGF-Rezeptor besitzt beispielsweise HER3 sieben potentielle Bindungsstellen für die PI3-Kinase (Soltoff *et al.*, 1994).

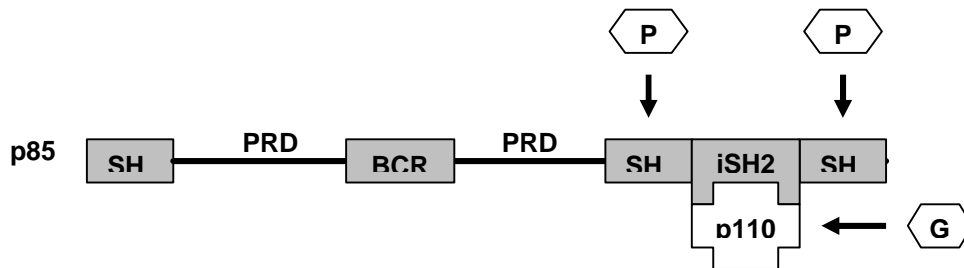


Abb. 14: Schematische Darstellung der Komponenten eines p85/p110 Heterodimers in Säugetierzellen

Die regulatorische p85 Untereinheit besteht aus einer SH3-Domäne, zwei Prolin-reichen Domänen (PRD), welche durch eine *breakpoint cluster region* (BCR) homologe Region voneinander getrennt sind, und zwei SH2-Domänen, zwischen denen sich eine *inter SH2* (iSH2) Domäne befindet, an welche die p110 Untereinheit (nur schematisch als Kreuz dargestellt) binden kann. Mit Pfeilen markiert sind die Hauptbindungsstellen für Aktivatoren der PI3-Kinase. P: Phosphotyrosin Proteine. G: kleine G-Proteine (modifiziert nach Krasilnikov, 2000).

Durch die PI3-Kinase gebildetes PIP3 kann durch Phosphatasen wieder in PIP2 umgewandelt werden (Abb. 15). Anhand des Wirkmechanismus unterscheidet man zwei Arten von Phosphatasen: während SHIP1 und SHIP2 PIP3 an der Position 5 des Inositolringes dephosphorylieren, was zu PI(3,4)P2 führt, verursacht die Phosphatase PTEN eine Dephosphorylierung von PIP3 an der Position 3 des Inositolringes, wodurch PI(4,5)P2 gebildet wird. Ein Verlust des PTEN-Proteins oder seiner Funktion wurde in einer Vielzahl von Tumoren gefunden. Maehma und Dixon (1999) spekulieren, dass unkontrollierte Signalweiterleitungen über die PI3-Kinase zu invasiven Tumoren führen.

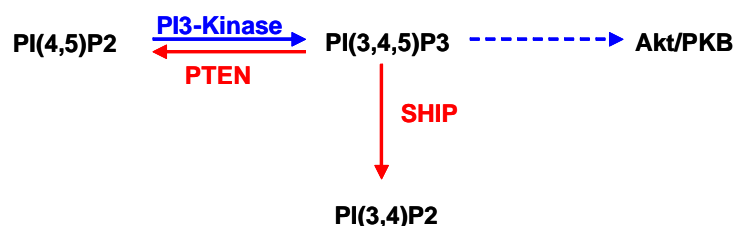


Abb. 15: Bildung und Dephosphorylierung von PI(3,4,5)P3
Erklärung siehe Text.

4.4 Akt / Proteinkinase B (PKB)

Die Akt/PKB gehört zur Klasse der Serin/Threonin-Kinasen und wurde 1995 von zwei Arbeitsgruppen als wichtiges Effektorprotein der PI3-Kinase identifiziert (Burgering und Coffey, 1995; Franke *et al.*, 1995). In Säugetierzellen wurden drei Haupt-Isoformen der Akt/PKB entdeckt, welche von drei unterschiedlichen Genen kodiert werden. Ihre Aminosäure-Sequenz ist zu 81% (Akt2 zu Akt1) bzw. 83% (Akt3 zu Akt1) identisch (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000). Die Kinasen, welche ubiquitär in Säugern exprimiert werden, zeichnen sich durch gleiche strukturelle Organisation aus (Kandel and Hay, 1999; Abb. 16). Die Akt/PKB ist in Vorgänge der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose-Regulation und des Vesikeltransports involviert. Eine Aktivierung der Akt/PKB über die PI3-Kinase wird durch PI(3,4,5)P3 induziert. Durch die Interaktion der PH-Domäne der Serin/Threonin-Kinase mit PI(3,4,5)P3 wird die Kinase-Dimerisierung induziert (Datta *et al.*, 1995; Franke *et al.*, 1997). Die Aktivierung der Akt/PKB über die PI3-Kinase kann über verschiedene Signalwege, wie z.B. den EGF-vermittelten EGF-Rezeptor-Signalweg oder über die Integrin/FAK-Kaskade induziert werden (Banfic *et al.*, 1998; Khwaja *et al.*, 1997; King *et al.*, 1997). Eine Vielzahl von Effektorproteinen ist für die Akt/PKB bekannt. Zu diesen Effektorproteinen zählen beispielsweise GSK-3 β (Proliferation und Apoptose-Regulation), NF- κ B, Bad, Caspase-9 (Apoptose-Regulation) und Proteine, die in die Angiogenese und DNA-Reparatur involviert sind.

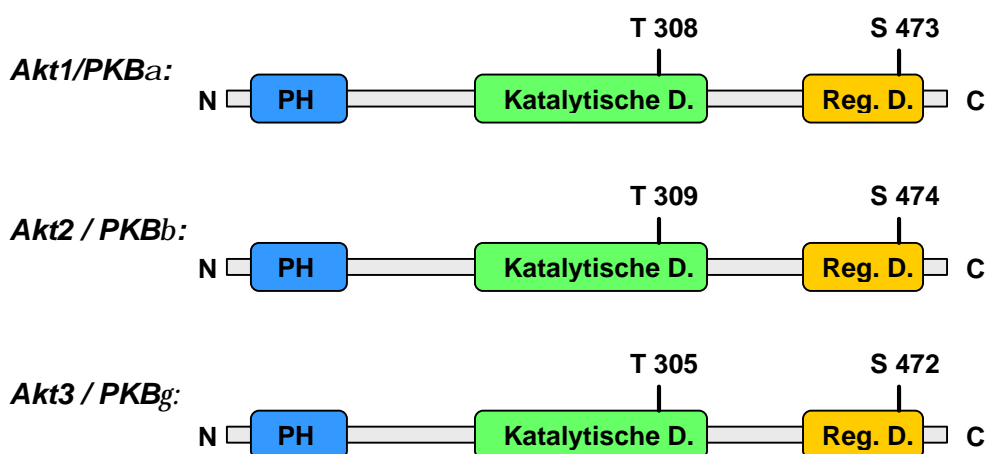


Abb. 16: Schematische Darstellung der drei Akt/PKB Haupt-Isoformen

Alle drei Akt/PKB Haupt-Isoformen tragen eine Pleckstrin Homologe (PH) Domäne am Amino-Terminus (N), eine Katalytische Domäne (Katalytische D.) sowie eine potentielle Regulatorische Domäne (Reg. D.) am Carboxy-Terminus (C). Die Region zwischen der PH und der Katalytischen Domäne ist Glycin-reich. Dargestellt sind die zur Aktivierung der Kinase phosphorylierten Threonin-(T) und Serin-(S) -Reste (modifiziert nach Kandel und Hay, 1999).

4.5 Mitogen aktivierte Protein (MAP)-Kinasen

Mitogen aktivierte Protein (MAP)-Kinasen regulieren unterschiedliche zelluläre Vorgänge, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. In Säugetierzellen wurden drei Unterklassen der MAP-Kinase Familie identifiziert:

- ERK (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase) (Derijard *et al.*, 1995)
- JNK / SAPK (c-Jun N-terminale / Stress-aktivierte Proteinkinasen) (Gupta *et al.*, 1995)
- p38 / RK / Mpk2 Kinasen (Lewis *et al.*, 1998)

Die Spezifität der MAP-Kinase-Interaktionen sowie die Stimulation ihrer *downstream* Moleküle hängen weitgehend davon ab, welcher Subtyp der MAP-Kinasen aktiviert wurde. ERKs werden hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren stimuliert und sind in Zellwachstum und Zelldifferenzierung involviert. JNKs und p38 MAP-Kinasen werden hingegen vor allem durch Stress, wie z.B. Strahlung oder Hitzeschock, aktiviert und spielen auch neben oben genannten Vorgängen eine Rolle bei der Synthese von Zytokinen (Lowes *et al.*, 2002). MAP-Kinase-Kaskaden zeichnen sich durch einen gleichen organisatorischen Aufbau aus. Sie bestehen aus einer MAP-Kinase (MAPK), einem MAP-Kinase Aktivator (MEK, MKK oder MAPK-Kinase), sowie einem MEK-Aktivator (MEK-Kinase (MEKK) oder MAPK-Kinase Kinase) (Abb. 17). Die Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges wird durch RTKs, siebenständige Rezeptoren und zytoplasmatische Onkogene vermittelt (Della Rocca *et al.*, 1997; Daub *et al.*, 1996; Luttrell *et al.*, 1994). Die enzymatische Aktivierung der MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 erfolgt dabei über zweifach-spezifische Proteinkinasen (Gomez und Cohen, 1991; Crews *et al.*, 1992), welche spezifische Threonin- und Tyrosinreste in einem bestimmten Tripeptid-Motiv (TXY) phosphorylieren. Jede Unterfamilie zeichnet sich durch ein charakteristisches Tripeptid-Motiv aus: ERK (TEY), JNK (TPY), p38 (TGY).

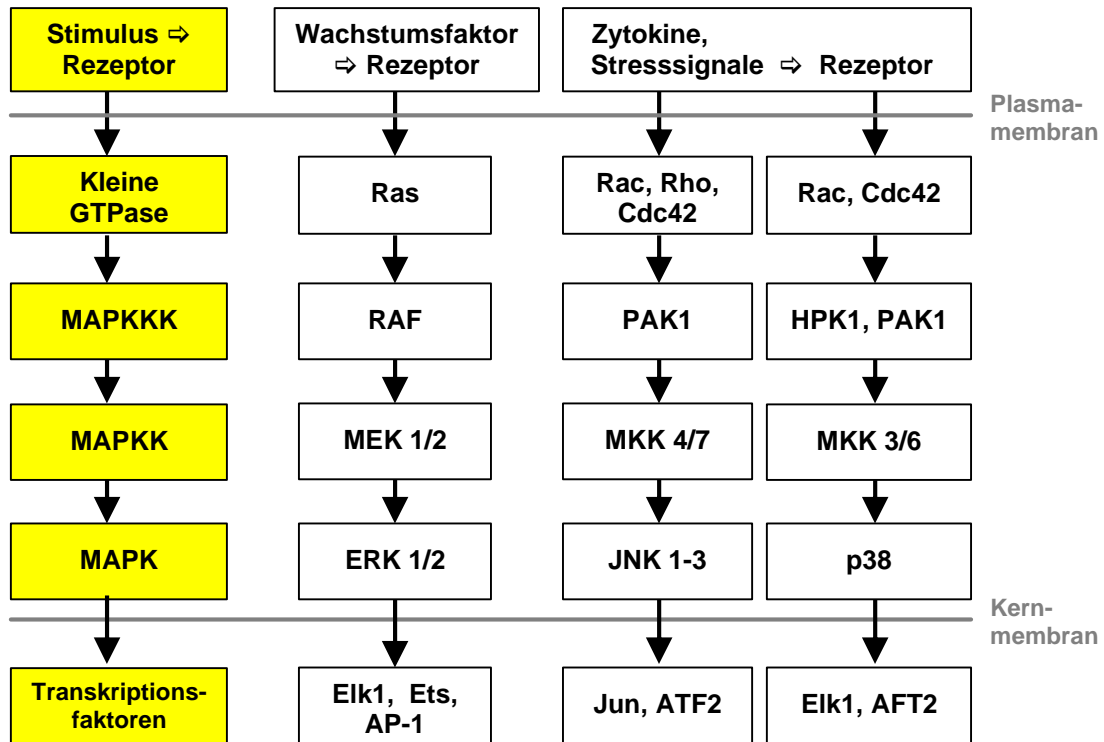


Abb. 17: Kaskadensystem der MAP-Kinase-Signaltransduktionswege
 Erklärung siehe Text (modifiziert nach Schnelzer, 2001).

Aktiviert ein Wachstumsfaktor oder ein anderer Ligand eine Membranständige RTK, kommt es zur Rezeptor-Dimerisierung und einer Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste der Rezeptoren. Im Falle der ERK-MAP-Kinase-Signaltransduktion assoziiert anschließend ein Adaptorprotein (z.B. Shc, Grb2) an den aktivierten Rezeptor. An Grb2 bindet weiterhin der *exchange factor* Sos, der einen Austausch von GDP durch GTP vermittelt. Sos ist in der Lage, die kleine GTPase Ras zu aktivieren. Aktiviertes H-Ras bildet schließlich mit der Serin/Threonin-Kinase cRaf einen bimolekularen Komplex, der an die Plasmamembran rekrutiert wird. Dadurch wird die MAPK-Kinase MEK1 phosphoryliert, welche ERK1/2 aktiviert. Die aktivierten MAP-Kinasen ERK1/2 werden daraufhin in den Zellkern transloziert, wo sie u.a. verschiedene Transkriptionsfaktoren der AP-1 und Ets-Familie aktivieren. Die Transkriptionsfaktoren assoziieren an geeignete DNA-Bindungsstellen in Promotorregionen und regulieren dadurch die Transkription von Zielgenen.

Eine Beteiligung der kleinen Rho-GTPasen Rac, Rho (nur bei JNK) und Cdc42 in der Signalweiterleitung über JNK und p38 MAP-Kinase wurde beschrieben (Coso *et al.*, 1995). In ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form können diese GTPasen

die MAPKKK PAK1 (p21 aktivierte Kinase) aktivieren. Über die entsprechende MAPKK wird das Signal weiter zu den MAP-Kinasen JNK bzw. p38 geleitet, wodurch Transkriptionsfaktoren im Zellkern wie bei der ERK-Signalkaskade reguliert werden (Abb. 17).

4.6 Ras- und Rho-GTPasen

Die Ras-Superfamilie spielt bei der intrazellulären Signalübertragung eine zentrale Rolle. Zur Ras-Superfamilie zählen die drei GTPasen H(arvey)-Ras, K(irsten)-Ras (mit den beiden Spleißvarianten K-RasA und K-RasB) und N-Ras, welches an der Plasmamembran lokalisiert ist. Die Ras-Superfamilie umfasst mehr als 100 kleine, monomere GTPasen, welche 20-30 kDa groß sind (Matozaki *et al.*, 2000). Diese kleinen GTPasen lassen sich strukturell in fünf Unterklassen einteilen (Abb. 19): Ras, Rab, Rho, Ran und Sar1/Arf (Matozaki *et al.*, 2000). Von diesen Unterklassen sind die Mitglieder der Ras- und Rho-Familie am besten charakterisiert. Auf Aminosäureebene liegt eine 30%ige Homologie zwischen den Mitgliedern der Ras- und Rho-Familie vor (Khosravi-Far *et al.*, 1998). Die Rho-Familie besteht aus 14 verschiedenen Proteinen (Abb. 18), welche 50-90% homolog zueinander sind.

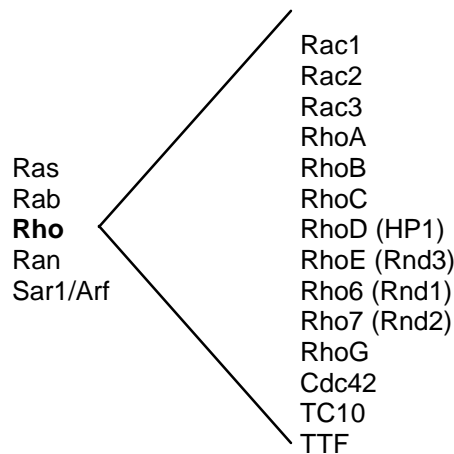


Abb. 18: Ras-Superfamilie (links) mit den Mitgliedern der Rho-Familie (rechts)

Ähnlich wie Ras-Proteine agieren Rho-ähnliche GTPasen als molekulare Schalter, d.h. es findet ein Wechsel zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Status statt (Abb. 19). Der Austausch von GDP durch GTP findet in der Switch I Domäne statt und wird durch drei Klassen von

Proteinen reguliert (Boguski und McCormick, 1993; Van Aelst L und D'Souza-Schorey C, 1997). Dabei handelt es sich um:

- *Guanine Nucleotide Exchange Factors* (GEFs), z.B. Dbp, Vav, Sos, Tiam1
- *GTPase Activating Proteins* (GAPs), z.B. IQGAP1
- *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors* (GDIs)

GEFs induzieren einen GDP/GTP-Austausch und führen dadurch zur Aktivierung Rho-ähnlicher GTPasen. Nur die aktivierte GTPase-Form ist in der Lage, an Effektorproteine zu binden und eine intrazelluläre Signalweiterleitung auszulösen. GAPs vermitteln eine Inaktivierung der GTPase durch Stimulation der intrinsischen GTP-Hydrolyserate, wodurch ein Austausch von GTP durch GDP erfolgt. Die Interaktion von GDIs mit GTPasen inhibiert je nach gebundenem Nukleotid (GDP oder GTP) entweder die GDP-Dissoziation oder die GTP-Hydrolyse.

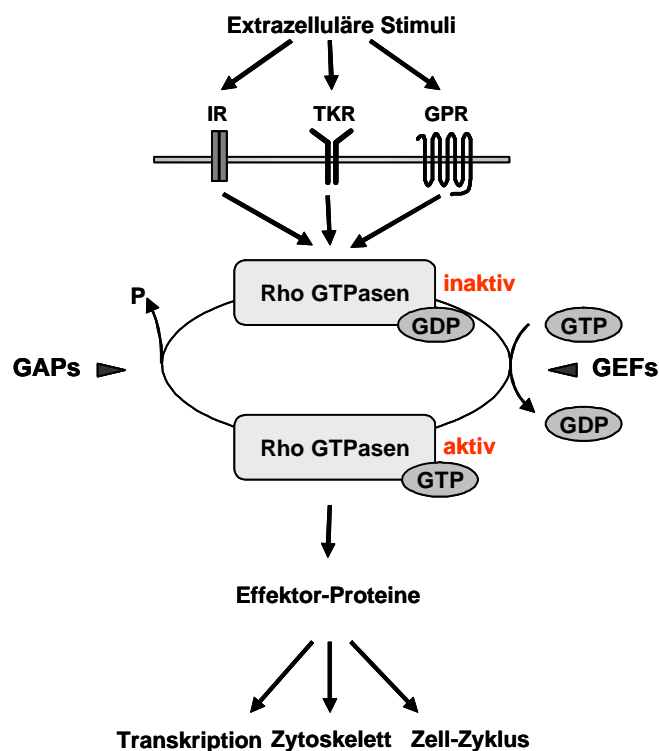


Abb. 19: Schematische Darstellung des Aktivierungszyklus der Rho-GTPasen

Ist GTP an Rho-GTPasen gebunden, so sind sie aktiv, ist GDP gebundenen, dann sind sie inaktiv. GAPs: *GTPase activating proteins*. GEFs: *Guanine nucleotide exchange factors*. P: Phosphat. IR: Integrinrezeptor; TKR: Tyrosinkinase-Rezeptor; GPR: G-Protein Rezeptor.

Eine Wechselwirkung zwischen E-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Adhäsivität und den Rho-GTPasen wurde kürzlich beschrieben. Während Rac1 an den Zell-Zell-Kontaktstellen lokalisiert ist, lässt sich Cdc42 sowohl an den Zell-Zell-Kontakten, als auch am Golgi-Apparat nachweisen (Fukata und Kaibuchi, 2001). Im Gegensatz zu Rac1 und Cdc42 ist RhoA hauptsächlich im Zytosol lokalisiert. Zwischen den drei GTPasen besteht ein *Cross-Talk*, d.h. die GTPasen stehen in engem Zusammenhang und beeinflussen sich gegenseitig. In NIH3T3 Fibroblasten führen konstitutiv-aktives Rac1 und Cdc42 zu einer Herabregulation der Aktivität von RhoA (Abb. 20; Sander und Collard 1999). Im Gegensatz dazu wird die Rac-Aktivität durch Rezeptor-vermittelte oder konstitutive Rho-Aktivierung nicht beeinflusst, was darauf hindeutet, dass es sich um eine unidirektionale Signalweiterleitung von Rac zu Rho handelt (Sander und Collard 1999). Ähnliche Untersuchungen in Fibroblasten-ähnlichen COS7 und epithelialen MDCK-Zellen ergaben eine vom Zelltyp unabhängige Regulation von Rho durch Rac1 in beiden Zelllinien.

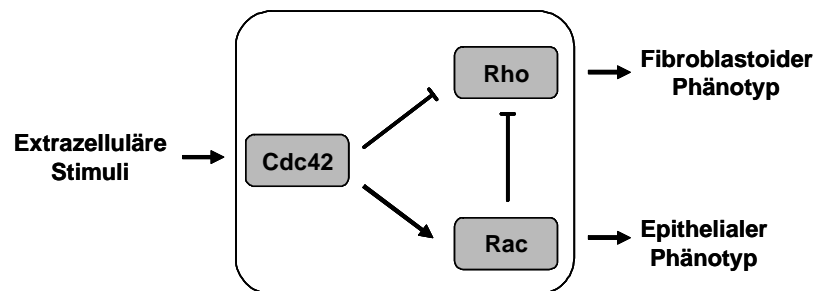


Abb. 20: *Cross-Talk* zwischen den Rho-GTPasen Cdc42, Rho und Rac in Fibroblasten
 Erklärung siehe Text (modifiziert nach Evers *et al.*, 2000).

Die 21,5 kDa große GTPase Rac1 wird im Organismus ubiquitär exprimiert. Sie ist in die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, d.h. die Ausbildung von Lamellipodien, involviert (Hall *et al.*, 1998) und gilt als ein Schlüssel-Regulator der Zellmotilität und Zelladhäsivität (Knaus *et al.*, 1998). Als wichtige Effektorproteine von Rac1 wurden die PAK-Familie, IQGAP1/2, die PI3-Kinase und Tiam1 beschrieben (Aspenström, 1999). Neben der Aktin-Zytoskelett-Reorganisation nimmt die GTPase weiterhin eine wichtige Stellung bei der Entstehung und Aufrechterhaltung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsivität ein (Akhtar *et al.*, 2000; Braga *et al.*, 1997; Kuroda *et al.*, 1998; Nakagawa *et al.*, 2001; Taikashi *et al.*, 1997). In kürzlich durchgeführten Studien mit Fluoreszenz-markierten Rac1-Fusionsproteinen konnte

gezeigt werden, dass Rac1 und E-Cadherin sowohl an den Zell-Zell-Kontakten, als auch nach deren Auflösung, z.B. durch Kalzium-Entzug, im Zytoplasma kolo-kalisieren (Akthar *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2001). Nakagawa und Kollegen beschrieben des Weiteren, dass Rac1 durch die Bildung von Zell-Zell-Kontakten aktiviert wird (Nakagawa *et al.*, 2001). In humanen Keratinozyten und MDCK-Zellen wurde gezeigt, dass dominant-negatives N17Rac die Organisation der Aktinfilamente an den Stellen der Zell-Zell-Adhäsion zerstört. Die Effizienz hängt allerdings vom Reifungsgrad der Zell-Zell-Kontakte und dem Zelltyp ab (Braga *et al.*, 1999). Eine Inaktivierung von Rac oder Rho führt zu einer Dissoziation von E-Cadherin und seinen Komplexmitgliedern von den *Adherens Junctions* (Braga *et al.*, 1997; Jou and Nelson, 1998; Takaishi *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1997). Konstitutiv-aktives V12Rac hingegen induziert in MDCK-Zellen eine Akkumulation von E-Cadherin, den Cateninen und F-Aktin an den Stellen der Zell-Zell-Kontakte (Hordijk *et al.*, 1997; Takaishi *et al.*, 1997).

Kürzlich wurde beschrieben, dass das *GTPase activating protein* IQGAP1 eine wichtige Rolle in der Dissoziation von Zell-Zell-Adhäsionen spielt. IQGAP1 ist an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert und reguliert negativ die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsivität, indem es mit β -Catenin an dessen Aminotermminus (AS 1-183) interagiert. Diese Interaktion führt zur Dissoziation von α -Catenin vom E-Cadherin-Komplex, da sich die Bindedomäne für α -Catenin in der gleichen Region in β -Catenin wie die Bindedomäne für IQGAP1 befindet (Fukata *et al.*, 1999), d.h. IQGAP1 und α -Catenin konkurrieren um die Bindung an β -Catenin. Aktives Rac1 und Cdc42 regulieren demzufolge positiv die Zell-Zell-Adhäsivität, indem sie an IQGAP1 binden und somit die Interaktion mit β -Catenin inhibieren (Fukata *et al.*, 1999). Dies führt zu einer Stabilisierung des Cadherin/Catenin Komplexes (Fukata *et al.*, 1999; Fukata *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 1998). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass E-Cadherin in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen einem E-Cadherin- β -Catenin- α -Catenin-Komplex und einem E-Cadherin- β -Catenin-IQGAP1-Komplex an den Zell-Zell-Kontakten vorliegt (Abb. 21).

Das Verhältnis zwischen den beiden Komplexen bestimmt demnach die Stärke der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsivität. Fukata und Kollegen (2001) zeigten, dass die Dissoziation von α -Catenin vor der Dissoziation von E-Cadherin und β -Catenin von den Zell-Zell-Kontakten erfolgt, d.h. während α -Catenin bereits im Zytoplasma detektiert werden konnte, waren E-Cadherin und β -Catenin noch in den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert.

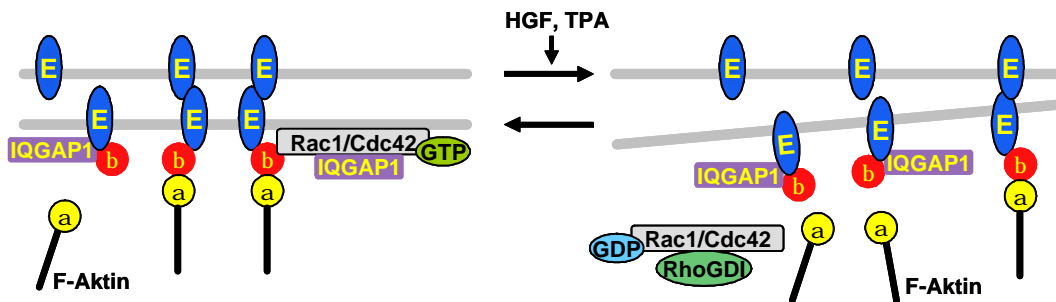


Abb. 21: Funktion von IQGAP1 bei der Regulation E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsivität

Erklärung siehe Text. E: E-Cadherin; α : α -Catenin; β : β -Catenin; HGF: *hepatocyte growth factor*; TPA: 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (modifiziert nach Fukata und Kaibuchi, 2001).

Rac1 ist jedoch nicht nur an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt, sondern nimmt weiterhin eine wichtige Stellung in der Signaltransduktion ein, d.h. es ist an der Signalübermittlung von der Zelloberfläche zum Zellkern beteiligt. Neben der Stimulation der MAP-Kinasen c-Jun und p38 durch Rac1 induziert die GTPase ebenso wie RhoA und Cdc42 die Zellzyklus-Progression in der G1-Phase und die DNA-Synthese (Knaus *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Rho-Familie besitzen Rac-Proteine die Fähigkeit, die Aktivität des NADPH-Oxidase-Komplexes in phagozytierenden Zellen, wie neutrophilen Granulozyten, zu regulieren (Abo *et al.*, 1991; Knaus *et al.* 1991). Durch diesen Komplex wird das Superoxidanion in einer als *oxidative burst* genannten Reaktion gebildet, welches eine wichtige Rolle in den zellulären Abwehrmechanismen gegenüber Bakterien spielt.

5. Aufgabenstellung

Mutationen im Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin treten in ca. 50% diffuser Magenkarzinome gehäuft im Exon 8 oder 9 auf. In Vorarbeiten der Institute für molekulare Pathologie der TU-München und GSF Neuherberg wurde gezeigt, dass E-Cadherin-Mutationen (*in frame* Deletion von Exon 8 (*del8*) oder Exon 9 (*del9*), Punktmutation in Exon 8 (*p8*), D370A) im Vergleich zu Wildtyp-E-Cadherin (*wt*) in MDA-MB-435S Zellen zu einer erhöhten Motilität und reduzierten Adhäsion führen. Basierend auf diesen Ergebnissen war das Gesamtziel vorliegender Arbeit, den Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf Motilitäts-relevante Signalwege und Signalmoleküle zu untersuchen, und dadurch therapeutisch interessante Zielmoleküle für Therapieansätze zur Behandlung maligner Tumoren mit E-Cadherin Mutationen zu identifizieren. Deshalb wurden folgende Aufgabenstellungen in vorliegender Arbeit bearbeitet:

1. Etablierung eines Testsystems zur Durchführung der Einzelzellanalyse E-Cadherin-exprimierender (*wt*, *del9*, *del8* oder *p8*) MDA-MB-435S Zellen und des Einflusses verschiedener Inhibitoren und Aktivatoren auf die Zellmotilität. Dieses Testsystem stellt eine wichtige Voraussetzung zur Durchführung vorliegender Arbeit dar.
2. Identifikation von Signalwegen und -molekülen, welche für die durch mutiertes E-Cadherin erhöhte Zellmotilität verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang sollte vor allem durch zell- und molekularbiologische Methoden die Motilitäts-assoziierte EGF-Rezeptor/PI3-Kinase-Signalkaskade sowie die GTPase Rac1 untersucht werden. Identifizierte Zielmoleküle dienen als Grundlage für neue Therapieansätze zur Behandlung maligner Tumoren mit E-Cadherin-Mutationen.
3. Herstellung von E-Cadherin-EGFP (EcadEGFP)-Expressionskonstrukten (*wt*- und mutiertes E-Cadherin) und Etablierung stabiler MDA-MB-435S Zelllinien, welche die Fusionsproteine exprimieren. Dadurch soll erstmals die räumliche und zeitliche Verteilung von mutiertem E-Cadherin in lebenden Zellen untersucht werden.

C MATERIAL UND METHODEN

1. MATERIAL

1.1 Geräte

AbiPrism™ 377 DNA Sequenzer	Perkin-Elmer, Überlingen
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, München
EagleEye (Bildgebend)	Stratagene, Heidelberg
FACS EPICS® XL	Beckmann Coulter, Krefeld
Filmentwicklungsgerät	AGFA, München
Gelkammern, horizontal	BioRad, München
Gelkammern, vertikal	BioRad, München
Heiz-/ Rührgerät	IKA-Labortechnik, Staufen
Kühlzentrifuge 5471R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 4K15	Sigma, Deisenhofen
Nassblotapparatur	Bio-Rad, München
Schüttler	Heidolph, Kelheim
Speedvac	Savant, Farmingdale, USA
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus, München
Thermocycler Primus 96 ^{plus}	MWG-Biotech, Ebersberg
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Transjector 5246 mit InjectMan	Eppendorf, Hamburg
UV-Leuchtschirm (312 nm)	Bachofer, Reutlingen
UV/Vis Spektrophotometer DU® 530	Beckmann, München
Waagen	Satorius, Göttingen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
Zeiss Axiovert 100 Konfokales Laser Scanning Mikroskop mit angeschlossener Inkubations- kammer (InkubatorS), Temperaturregulator (Tempcontrol 37-2 digital) und CTI Controller 3700 zur CO ₂ -Regulierung	Carl Zeiss, Jena
Zeiss Axiovert 135 Konfokales Fluoreszenz Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Zellzählgerät Z1	Coulter, München

1.2 Allgemeine Chemikalien

Aceton <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt
40% Acrylamid/Bisacrylamid Solution (37,5 : 1)	BioRad, München
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Aprotinin (from Bovine Lung)	Sigma, Deisenhofen
BioRad Protein Assay	BioRad, München
Bromphenol Blue-Xylene Cyanol Dye Solution	Sigma, Deisenhofen
Blue Dextran <i>Loading Buffer</i>	Applied Biosystems, Weiterstadt
Coomassie Blau R250	Sigma, Deisenhofen
Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
Ethanol <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ficoll	Biochrom, Berlin
Fluorescein Isothio-Cyanat-Dextran (FITC-Dextran)	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glutathion Sepharose Beads 4B	Amersham, Braunschweig
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Long Ranger	BMA, Rockland, ME, USA
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Meta Phor® Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Methanol <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
NP-40	Fluka, Neu-Ulm
Ovalbumin (Albumin, chicken egg)	Sigma, Deisenhofen
Pansorbin Cells, standardized	Calbiochem, Schwalbach
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
SeaKem® LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 20% Solution	Eurobio, Raunheim
TBE Puffer 10fach	BioRad, München
N', N', N', N' – Tetramethylenethylendiamin (TEMED)	BioRad, München
Tris	USB, Cleveland, Ohio
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

Sonstige allgemeine Chemikalien wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen.

1.3 Enzyme

Alle für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme sowie dazugehörige Puffer wurden von der Firma Boehringer Ingelheim (Mannheim) bezogen.

1.4 Kommerzielle Komplettsysteme

Assay-on-Demand	Applied Biosystems, Weiterstadt
CELLlection™ Pan Mouse IgG Kit	Dynal, Hamburg
DNeasy Tissue Kit	QIAGEN, Hilden
DyeEx™ Spin Kit	QIAGEN, Hilden
ECL Western-Blot-Reagenzien	Amersham, Braunschweig
Molekulargewichtsmarker (DNA): HAE III	Roche, Mannheim
Molekulargewichtsmarker (Protein): RPN 756 RPN 800	Amersham, Braunschweig
QIAprep Plasmid-Kit (midiprep)	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Quick-Change™ Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Rac Activation Assay Kit (non radioactive)	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA
Transfektionssystem TransFast™	Promega, Madison, USA
XTT-Zellproliferations- und Vitalitätsassay	Roche, Mannheim

1.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

L-CAM-Puffer 10fach:	1,4	M	NaCl
	47	mM	KCl
	7	mM	MgSO ₄
	12	mM	CaCl ₂
	10	mM	HEPES, pH 7,4
NET-Puffer :	5	mM	EDTA, pH 8,0
	50	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	100	mM	NaCl
	⇒ vor Gebrauch 1% (v/v) Triton X 100 zugeben		
Ovalbumin-NET-Puffer:	NET-Puffer mit 1 mg/ml Ovalbumin		

Proteindenaturierungspuffer: (4fach)	250	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	8	% (w/v)	SDS
	40	% (w/v)	Glycerin
	20	% (w/v)	β-Mercaptoethanol
	0,02	% (w/v)	Bromphenolblau
Proteingel-Laufpuffer (5fach):	0,96	M	Tris
	0,125	M	Glycin
	0,2	% (w/v)	SDS
Transferpuffer:	25	mM	Tris
	192	mM	Glycin
	20	% (v/v)	Methanol
TBST - Puffer:	150	mM	NaCl
	50	mM	Tris / HCl, pH 8,0
	1	% (v/v)	Tween 20
DNA-Auftragungspuffer (5fach):	100	mM	EDTA
	10	% (w/v)	Ficoll
	0,5	% (w/v)	SDS
	0,25	% (w/v)	Bromphenolblau

1.6 Antikörper

Die Bezeichnungen mAK bzw. pAK stehen in folgender Tabelle für monoklonaler bzw. polyklonaler Antikörper.

mAK Maus-Anti-E-Cadherin (# C20820)	Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA
mAK Maus-Anti-EGFR (# E12020)	Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA
mAK Maus-Anti-GFP (# 8362-1)	Clontech, Heidelberg
mAK Maus-Anti-PI3-Kinase (p85) (# P13020)	Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA
mAK Maus-Anti-Rac (# 05-389)	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA
pAK Kaninchen-Anti-Akt (# 9272)	NEB, Frankfurt
pAK Kaninchen-Anti-phospho-Akt (Ser473) (# 9271)	NEB, Frankfurt
pAK Kaninchen-Anti-β-Catenin (# C2206)	Sigma, Deisenhofen
pAK Kaninchen-Anti-phospho-β-Catenin (Thr41/Ser45) (# 9565)	NEB, Frankfurt
pAK Kaninchen-Anti-EGF-R (# sc-03)	Santa Cruz, CA (USA)
pAK Kaninchen-Anti-p44/p22 MAP Kinase (# 9102)	NEB, Frankfurt

pAK Kaninchen-Anti-phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) (# 9101S)	NEB, Frankfurt
pAK Kaninchen-Anti-MMP3 (# SA-104)	Biomol, Hamburg
pAK Kaninchen-Anti-PI3-Kinase p85 (# 06-195)	Upstate Biotechnology, Placid, NY, USA
Ziege-Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt (# 12-348)	Upstate Biotechnology, Placid, NY, USA
Ziege-Anti-Maus IgG, DTAF-gekoppelt (#115-016-062)	Dianova, Hamburg
Ziege-Anti-Maus IgG, FITC-gekoppelt (#115-095-062)	Dianova, Hamburg
Ziege-Anti-Maus IgG, TRITC-gekoppelt(#115-025-062)	Dianova, Hamburg
HECD-1	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA
SHE78-7	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA
Anti-Maus-IgG, Phalloidin-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Anti-Guinea Pig-IgG, Rhodamin gekoppelt	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA

1.7 Vektoren und Plasmide

pGEX L61Rac	}	wurden uns freundlicherweise von Prof. A. Hall (MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, London) zur Verfügung gestellt
pGEX N17Rac		
pEGFP-N2 Vektor	}	Clontech, Heidelberg
pBK-CMV mit verschiedenen E-Cadherin Insertionen	}	wurden uns freundlicherweise von Dr. G. Handschuh (München) zur Verfügung gestellt

1.8 Oligonukleotide

Zum Sequenzieren der EcadEGFP-Klone wurden die in nachfolgender Tabelle aufgeführten Primer verwendet. Alle Oligonukleotide mit einem vorausgehenden "r" in der Bezeichnung sind "reverse" Oligonukleotide.

Startnukleotid	Sequenz in 5' ® 3' Orientierung	Pos. im Vektor pEGFP-N2
pEGFP-N2seq	TGGATAGCGGTTTACTCAGC	397 - 417
pEGFP-N2rev	GTGGTG CAGATGAACTTCAGG	834 - 814

Startnukleotid	Sequenz in 5' ® 3' Orientierung	Pos. im humanen E-Cadherin (Klon HSECAD)
pre 1	CGAGAGCTACACGTTACGGTG	196 - 217
pre 2	CTCGACACCCGATTCAAAGTG	305 - 325
Ex 5	CTTCTGCAGCAACAAAGACAAAGAAGG	624 - 650
Ex 7/1	CACCATCCTCAGCCAAGATCC	1000 - 1020
Ex 9/2a	CAGCGTGGGAGGCTGTATACAC	1314 - 1335
Ex 11	TGGCTGGAGATTAATCCGGAC	1688 - 1708
Ex 12a	GTTCTCCAGTTGCTACTGGAACAG	1712 - 1735
Ex 13	GGCGTCTGTAGGAAGGCACAG	2171 - 2191
Ex 13a	CCCAAGAATCTATCATTTTGAAGCC	2031 - 2055
cyto1a	TGCCAATCCCGATGAAATTGG	2497 - 2517
rEx 4 / neu	GGTGGAGTCCCAGGCGTAGAC	412 - 392
rEx 6	CTGGAAGAGCACCTTCCATGAC	832 - 811
rEx 8/2	TGTTGTGCTTAACCCCTCACCTTG	1047 - 1051
rEx 10/2	CCACATTCGTCACTGCTACG	1374 - 1359
rEx 11	TGTGTACGTGTTCTTCACGTG	1780 - 1757
rEx 13	TCAGAATTAGCAAAGCAAGAATTCC	2170 - 2146
r3' / neu	CTCATCTCAAGGGAAGGGAGC	2836 - 2816

1.9 Reagenzien und Medien für eukaryotische Zellkultur

Die verwendete eukaryotische Zelllinie MDA-MB-435S wurde von der Firma ATCC (Rockville, MD, USA) bezogen. Inzwischen hat sich ein wichtiger neuer Aspekt zur Herkunft der MDA-MB-435S Zelllinie ergeben. Während MDA-MB-435S Zellen als gängiges Mammakarzinom-Modell etabliert war, stellen kürzliche Untersuchungen des Transkriptoms dieser Zellen dies in Frage (Ellison *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2000). Diese Arbeiten geben Hinweise darauf, dass die MDA-MB-435S Zellen von einem okkulten Melanom und nicht vom Mammakarzinom der Patientin abgeleitet sein könnten. Allerdings hat dieser Sachverhalt keinen Einfluss auf die in vorliegender Arbeit durchgeführten Versuche.

Albumin Bovine Fraction V Solution (30%)	Sigma, Deisenhofen
Collagen Typ I (from rat tail)	Sigma, Deisenhofen
EGF	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco's MEM (with Glutamax, 4500 mg/l Glucose)	Gibco BRL, Eggenstein
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x) (with Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	PAA, Cölbe
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x) (without Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	PAA, Cölbe
FCS	PAN, Aidenbach
Fibronectin	Sigma, Deisenhofen

Geneticin (G418 Sulphat)	Gibco BRL, Eggenstein
LY 294002	Calbiochem, Bad Soden
PD 98059	Sigma, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Poly-d-Lysin	MatTek Corporation, Ashland, MA, USA
Tyrphostin AG 1478	Sigma, Deisenhofen
Versene	Gibco BRL, Eggenstein
Viralex™ Trypsin/EDTA (1x)	PAA, Cölbe
Vitronectin	Becton-Dickinson, Bedford, USA

1.10 Medien und Antibiotika zur Anzucht von Bakterien

<i>E. Coli</i> - Stämme:	Kompetente Bakterien JM 109 (Promega)
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Seromed Biochrom KG, Berlin
LB-Agar	Gibco BRL, Eggenstein
LB-Broth	Gibco BRL, Eggenstein
X-Gal	Sigma, Deisenhofen

1.11 Verbrauchsmaterial

3MM Papier, Whatmann	M&B Stricker, Oberschleißheim
BIOCAT Collagen I (100 mm <i>Dishes</i>)	Becton Dickinson, Heidelberg
CELLocate Coverslips (<i>Square Size</i> 55 µm)	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten 5, 10, 25 ml	Greiner, Frickenhausen
Falconröhrchen (15 ml, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Femtotips® Typ II, steril	Eppendorf, Hamburg
Hyperfilm™ ECL™	Amersham, Braunschweig
Küvetten (1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Microloaders, steril	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten (96well)	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Nitrozellulose Transfer Membran, 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Oak-Ridge-Röhrchen (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger (Super Frost, R. Langenbrinck, 76x26 mm)	Labor Schubert und Weiss, München
Petrischalen (für Bakteriologie)	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Petrischalen TPP (für Zellkultur)	In vitro Systems & Services, Göttingen
Reaktionsgefäße (1 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen für FACS-Analyse (5 ml, Ø 75x12 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Sequi-Blot™ PVDF-Membran	BioRad, München

2. METHODEN

2.1 Plasmidaufreinigung im kleinen Maßstab (Mini-Präp)

Die Plasmidaufreinigung im kleinen Maßstab eignet sich zur Kontrolle amplifizierter DNA und für Testrestriktionsanalysen. Es wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim *et al.* (1979, 1983) mit folgenden Puffern aus dem QIAGEN-Plasmid-Kit durchgeführt.

Puffer P1: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase

Puffer P2: 200 mM NaOH
1% (w/v) SDS

Puffer P3: 3 M Kalium-Acetat, pH 5,5

1 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde 1 min bei 15000 rpm (4°C) abzentrifugiert und das Bakteriensediment in 200 µl Puffer P1 resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer P2 und kurzem Mischen erfolgte nochmals eine Inkubation für 5 min/RT, wobei die Bakterien alkalisch lysiert wurden. Zur Neutralisierung der Suspension und Präzipitation von Proteinen wurden 200 µl Puffer P3 hinzupipettiert, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend die Zellreste durch Zentrifugation (15 min bei 15000 rpm, 4°C) von dem Lysat getrennt. Das Lysat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1,6 ml (1 Volumen) eiskaltem 100%igem Isopropanol für 30 min auf Eis gefällt. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 15000 rpm (4°C) wurde das DNA-Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50 µl H₂O bidest. gelöst.

2.2 Plasmidaufreinigung nach QIAGEN (Midi-Präp)

Für Klonierungen, Transfektionen und Sequenzierungen wurde Plasmid-DNA mit Hilfe eines QIAGEN-Plasmid-Kits isoliert. Das Verfahren entsprach den Angaben des Herstellers.

Puffer P1:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase
Puffer P2:	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
Puffer P3:	3 M K-Acetat, pH 5,5
Puffer QBT : (Äquilibrierungspuffer)	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% (v/v) Ethanol 0,15% (v/v) Triton X-100
Puffer QC : (Waschpuffer)	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% (v/v) Ethanol
Puffer QF : (Elutionspuffer)	1,25 M NaCl 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 15% (v/v) Ethanol

Das über Säulen gereinigte DNA-Sediment wurde abschließend in 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die DNA-Konzentration kann durch Messung eines Absorptionsspektrums zwischen 200 bis 300 nm bestimmt werden, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt.

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\text{gemessene OD}_{260} \times A \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

Dabei gilt: A = 50 µg/µl für doppelsträngige DNA
 40 µg/µl für einzelsträngige DNA und RNA
 33 µg/µl für einzelsträngige Nukleotide

Der Reinheitsgrad von DNA-Präparationen lässt sich durch die Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm abschätzen. Das Verhältnis zwischen OD₂₆₀ und OD₂₈₀ sollte ca. 1,8 betragen. Ist der Quotient >1,9, so liegt entweder eine RNA-Verunreinigung vor oder die DNA ist denaturiert. Bei einem Verhältnis von <1,6 handelt es sich um eine Protein- bzw. Phenolverunreinigung.

2.3 Aufreinigung von GST- Fusionsproteinen

Für die Expression und Reinigung von dominant-negativem N17Rac1 und konstitutiv-aktivem L61Rac1 (Braga *et al.*, 1997) wurden uns freundlicherweise von Prof. Alan Hall (MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, London) *E. coli* *Glycerolstocks* zur Verfügung gestellt, welche die jeweiligen Expressionsvektoren pGEX-2T-N17Rac1 bzw. pGEX-2T-L61Rac1 enthielten. In den pGEX-2T Expressionsvektoren, welche ein Gen für die Ampicillin-Resistenz tragen, sind N17Rac1 bzw. L61Rac1 jeweils an den C-Terminus des Enzyms Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert worden. Der Promotor des pGEX-2T Expressionsvektors enthält eine Lac-Operonsequenz als regulatorisches Element, wodurch die Expression von N17Rac1 bzw. L61Rac1 unter der Kontrolle des Lac Repressors steht. Durch die Wechselwirkung des Repressorproteins mit der Operatorsequenz wird somit die Transkription blockiert. Ein Induktor, wie z.B. das stabile Lactose-Analog Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid (IPTG), interagiert spezifisch mit dem Repressor, wodurch dieser von der DNA abdissoziiert und die Transkription von N17Rac1 bzw. L61Rac1 gestartet werden kann. Die Proteinsynthese wurde nach Erreichen der mittleren logarithmischen Phase der Bakterien ($OD_{600} = 0,8$) durch Zugabe von IPTG induziert, da in diesem Bereich eine maximale Syntheserate erreicht werden kann.

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte nach folgendem Protokoll: 3 ml LB-Medium + Ampicillin (100 μ g/ml) wurden mit 100 μ l Glycerolkultur angeimpft und für ca. 7 h bei 37°C geschüttelt (225 rpm). Aus dieser Vorkultur wurden 100 μ l in 100 ml LB-Medium (mit 100 μ g/ml Ampicillin) überführt und der Ansatz über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur zu 900 ml LB-Medium (mit 100 μ g/ml Ampicillin) gegeben und die Bakterien bei 37°C im Schüttler kultiviert, bis sie nach ca. 2 h eine $OD_{600} = 0,8$ erreicht haben. Anschließend erfolgte eine Induktion mit 0,1 M IPTG. Die Bakterien wurden für weitere 3 h bei 37°C geschüttelt, 10 min bei 4000 rpm (4°C) zentrifugiert, und das Bakteriensediment bei -80°C bis zur weiteren Proteinaufreinigung aufbewahrt.

Das Bakteriensediment wurde auf Eis aufgetaut und in 20 ml Lysispuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1mM EDTA, pH 7,5; 1 μ M GDP) resuspendiert und in ein 50 ml Oak-Ridge Röhrchen überführt. Zur Suspension wurden 1 μ g/ μ l Lysozym und 20 μ g/ml DNase I

pipettiert und das Gemisch kurz gevortext. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Suspension mit Glasbeads versetzt (ca. $\frac{3}{4}$ des Suspensionsvolumens) und 5 min stark geschüttelt, um die Bakterien aufzubrechen. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation (10000 rpm, 4°C) wurde das Lysat in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 2 ml Gluthation Sepharose Beads (GS-Beads), die vorher mit Lysis-Puffer gewaschen und äquilibriert worden waren, zum Lysat wurde der Ansatz 2,5 h langsam auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert, um die Komplexbildung von GS-Beads mit den GST-Fusionsproteinen zu ermöglichen.

In weiteren Schritten musste der GST-Teil der Fusionproteine abgespalten werden, um N17Rac1 und L61Rac1 für die Mikroinjektion einsetzen zu können. Die Komplexe wurden 5 min bei 3000 rpm (4°C) abzentrifugiert und dreimal mit je 10 ml Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 5 µl/ml Aprotinin; 1 µM GDP) gewaschen. Es schlossen sich zwei Waschschrte mit je 10 ml Thrombin-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 2,5 mM CaCl₂; 1 µM GDP) an. Zwischen dem exprimierten N17Rac1 bzw. L61Rac1 und dem GST-Teil befand sich eine Thrombin-Schnittstelle, an welcher die Zugabe von Thrombin zu einer Abspaltung von N17Rac1 bzw. L61Rac1 führt. Zu diesem Zweck wurden 2 ml Thrombin-Puffer und 20 U humanes Thrombin (Calbiochem, Schwalbach) zu den gewaschenen Komplexen gegeben und der Ansatz 45 min auf dem Drehrad (4°C) inkubiert. Durch Zugabe von 1 mM PMSF und 1 mM EDTA (pH 8,0) wurden die Thrombinfunktion abgestoppt. Die Ansätze wurden 5 min zentrifugiert (3000 rpm, 4°C) und der Überstand, der das abgespaltene Protein enthielt, in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Beads wurden noch dreimal mit je 2 ml Thrombin-Puffer (+1 mM PMSF; 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen und die gesammelten Überstände in einem Falcon-Röhrchen vereinigt.

Um die Überstände von dem zugegebenen Thrombin zu reinigen wurden 400 µl äquilibrierte Benzamidin-Beads zu dem Ansatz gegeben und 60 min auf dem Drehrad (4°C) inkubiert. Die Beads wurden für 5 min bei 3000 rpm (4°C) abzentrifugiert, der Überstand in einen Dialyseschlauch überführt (ZelluTrans, Roth; für Moleküle mit einer Größe über 8-10 kDa geeignet) und für 1 h bei 4°C in 2 l Dialysepuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF, 2% (v/v) Glycerol, 1 µM GDP) dialysiert. Nach der Dialyse über Nacht in frischem Dialysepuffer (2 l) wurden die Überstände noch zweimal dialysiert (in je 2 Liter Dialysepuffer; 25 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 7,5; 5 mM

MgCl₂; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF, 2% (v/v) Glycerol) und schließlich in vorbehandelte Centricon-Röhrchen (PALL, Dreieich) pipettiert. Nach einer Zentrifugation für 1-2 h bei 6000 rpm (4°C) wurde der Durchfluss verworfen und das aufgereinigte Protein, das sich auf der Membran des Centricon-Röhrchen befand (ca. 500 µl), aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.4 Herstellung von E-Cadherin-EGFP Konstrukten (EcadEGFP)

Zur Untersuchung der räumlichen und zeitlichen E-Cadherin-Verteilung während der Zellbewegung sollten MDA-MB-435S Zellen mit E-Cadherin-EGFP Konstrukten stabil transfiziert und in der Inkubationskammer analysiert werden. Für die Herstellung der Konstrukte wurden verschiedene Ausgangsvektoren verwendet: zum einen pBKCMV-Vektoren, welche entweder das *wt*-E-Cadherin-Gen oder das E-Cadherin-Gen mit einer Punktmutation in Exon 8 (GAT→GCT, D370A) enthielten, zum anderen der pEGFP-N2 Vektor von Clontech. Die pBK-CMV-Vektoren mit dem E-Cadherin-Insert wurden uns freundlicherweise von Frau Dr. G. Handschuh zur Verfügung gestellt. Die Vektoren sind in Abb. 22 abgebildet.

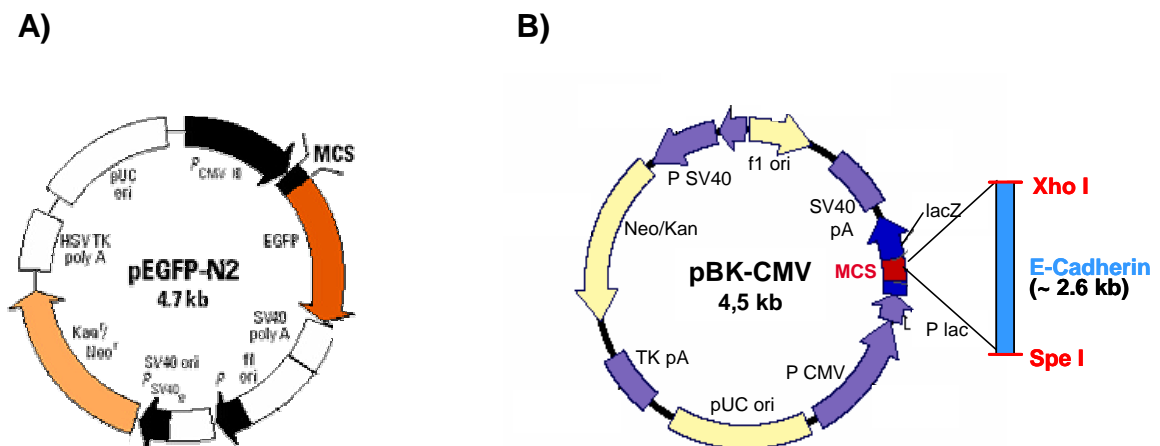


Abb. 22: Zur Herstellung von E-Cadherin-EGFP-Konstrukten verwendete Klonierungsvektoren

A: Klonierungsvektor pEGFP-N2 der Firma Clontech. B: Der von Frau Dr. G. Handschuh verwendete Klonierungsvektor pBK-CMV mit E-Cadherin-Insert.

Das *green fluorescent Protein* (GFP) ist ein sehr stabiles, aus 238 AS bestehendes Protein, welches in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt wurde (Abb. 23). Die für die Biolumineszenz notwendigen Komponenten beinhalten ein Kalzium-aktiviertes Photoprotein, das Aequorin, welches blau-grünes Licht emittiert, und ein akzessorisches, grün fluoreszierendes Protein (GFP), auf welches die Energie des Aequorins übertragen und als grünes Licht emittiert wird (Morise *et al.*, 1974).



Abb. 23: Grün fluoreszierende Quallen *Aequorea victoria* (Morise *et al.*, 1974)

In vorliegender Arbeit wurde eine modifizierte Form des GFP, das EGFP (*enhanced green fluorescent Protein*) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine GFP-Variante (Davenport *et al.*, 1955; Jefferson *et al.*, 1987; Morin *et al.*, 1971), in welcher durch Substitution 2 Aminosäuren im GFP-Gen verändert wurden: Phe⁶⁴ ⇒ Leu und Ser⁶⁵ ⇒ Thr. Die Folge der Substitutionen ist eine stärkere Fluoreszenz und eine höhere Expressionseffizienz in Säugetierzellen. Das Anregungsmaximum dieser Variante liegt bei 488 nm und ist somit für lebende Zellen weniger toxisch als die Anregung des *wt*-GFP bei 395 nm (Heim *et al.*, 1994). Das Emissionsmaximum liegt bei 507 nm.

Das Prinzip der Klonierung bestand darin, das E-Cadherin-Insert aus den pBK-CMV-Vektoren auszuschneiden und in den pEGFP-N2 Vektor so umzuklonieren, dass E-Cadherin und EGFP *in frame* vorlagen (Abb. 24).

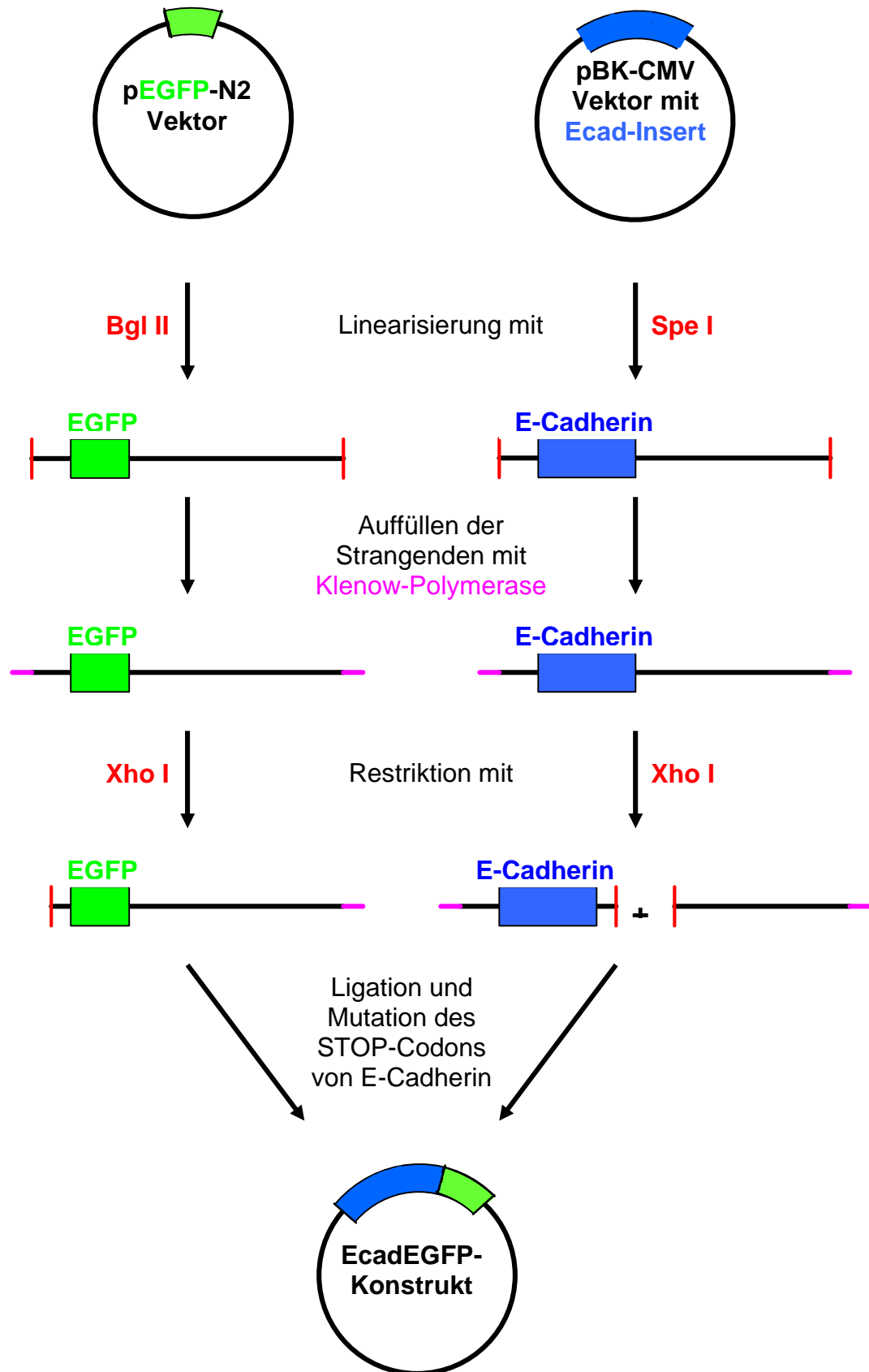


Abb. 24: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung von E-Cadherin-EGFP (EcadEGFP) Konstrukten
Erklärung siehe Klonierungsdurchführung.

Klonierungsdurchführung

1. Restriktion mit Bgl II und Spe I:

20 µg Plasmid-DNA des pEGFP-N2 Vektors wurden mit Bgl II und je 20 µg Plasmid-DNA der pBK-CMV Vektoren mit Spe I 1 h bei 37°C linearisiert.

Restriktionsansätze:

pEGFP-N2 Vektor:	10 µl	10 x Puffer M
	2 µl	Bgl II [10U/µl]
	20 µg	Plasmid-DNA
	⇒	ad 100 µl H ₂ O bidest.

pBK-CMV-Vektor mit E-Cadherin-Insert:	10 µl	10 x Puffer H
	2 µl	Spe I [10U/µl]
	20 µg	Plasmid-DNA
	⇒	ad 100 µl H ₂ O bidest.

Die Restriktionsansätze wurden auf einem 1%igen präoperativen Gel aufgetrennt. Die ausgeschnittenen Banden der linearisierten DNA wurden mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits von QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt, mit 120 µl Elutionspuffer eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

2. Auffüllen der Restriktionsenden mit Klenow-Polymerase:

<i>Ansätze:</i>	60 µl	linearisierte DNA
	10 µl	10 x Klenow-Puffer
	1 µl	Klenow-Polymerase [2U/µl]
	1 µl	10 mM dNTPs
	⇒	ad 100 µl H ₂ O bidest.

Die Enden der DNA wurden mittels *Klenow-Polymerase* aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 35 min bei 37°C wurde die der Reaktion mit je 200 µl H₂O bidest. abgestoppt und die DNA durch Phenolisieren und eine anschließende Ethanol-fällung gereinigt. Die gefällte DNA wurde in 40 µl TE-Puffer (pH 8,0) rückgelöst und mit Xho I geschnitten.

3. Restriktion mit Xho I:

Restriktionsansätze:

40 µl	DNA
8 µl	10 x Puffer H
1 µl	Xho I [10U/µl]
⇒	ad 80 µl H ₂ O bidest.

Nach einer 3-stündigen Inkubation der Restriktionsansätze bei 37°C wurden die Fragmente auf einem 1%igen präparativen Gel aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits von QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die gereinigte DNA wurde mit 30 µl Elutionspuffer eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

4. Ligation:

Ligationsansatz:

200 ng	pEGFP-N2 Vektor
400 ng	E-Cadherin-cDNA
1 µl	10 x Ligase Puffer
1 µl	T4-Ligase
⇒	ad 100 µl H ₂ O bidest.

Für die Ligation des pEGFP-N2 Vektors mit den verschiedenen E-Cadherin Fragmenten wurden die E-Cadherin-cDNA in einem 3 molaren Überschuss eingesetzt, um die Ligationseffizienz zu erhöhen. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C und wurde mit 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt.

5. Transformation kompetenter Bakterien:

Kompetente Bakterien JM109 (Promega) wurden zur Transformation verwendet. Zu je 50 µl Bakteriensuspension wurden je 5 µl der Ligationsansätze gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 sek bei 42°C im Wasserbad. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden die Ansätze auf 1 ml mit LB-Medium aufgefüllt und weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspensionen wurden auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von Klonen wurde DNA isoliert und die Größe der

Plasmid-DNA auf einem 1%igen Agarosegel überprüft. Je ein positiver Klon der verschiedenen ECadEGFP-Konstrukte (*wt*-EcadEGFP und *p8*-EcadEGFP) wurde zur weiteren Versuchsdurchführung ausgewählt. Um die richtige Orientierung des E-Cadherin-Inserts in dem pEGFP-N2 Vektor zu gewährleisten, erfolgte eine Sequenzierung der positiven Klone an den Übergängen von Vektor und Insert.

6. Mutation des STOP-Codons:

Aus mehreren Gründen war es notwendig, das STOP-Codon des E-Cadherin-Gens zu mutieren. Hätte man das Konstrukt so, wie es bis jetzt vorlag, für eine Transfektion verwendet, dann wäre es bei der Expression des Fusionsproteins bereits zu einem Translationsabbruch nach dem E-Cadherin gekommen. Weiterhin lag das EGFP-Gen noch nicht *in frame* im Vektor vor. Deshalb wurde ein zusätzliches Basenpaar in die Originalsequenz mittels des *Quick-Change™ Site Directed Mutagenesis Kits* eingefügt. Das Verfahren entsprach den Angaben des Herstellers.

Verwendete Mutationsprimer:

Ecad-mutseq: 5'-GGC GGC GAG GAC GAC TTA GGG GAC TCG AGC TCA AGC TTC G-3'
Ecad-mutrev: 3'-CCG CCG CTC CTG CTG AAT CCC CTG AGC TCG AGT TCG AAG C-5'

(rot markiert ist die eingefügte Mutation im STOP-Codon)

Die Transformation kompetenter Bakterien mit der im STOP-Codon mutierten Plasmid-DNA wurde ebenfalls nach Herstellerangaben des *Quick-Change™ Site Directed Mutagenesis Kits* durchgeführt. Von den verschiedenen Ansätzen wurden mehrere Klone gepickt, Plasmid-DNA mittels einer Midi-Präp isoliert und die DNA auf einem Agarosegel überprüft. Je 3 Klone wurden ausgewählt und die Mutation im STOP-Codon durch Sequenzanalyse überprüft. Da mehrere Klone positiv waren, wurde wiederum von jedem Konstrukt ein Klon für die weitere Durchführung der Experimente ausgewählt. Von diesen Klonen wurde DNA isoliert und MDA-MB-435S Zellen mittels der TransFast™ Methode transfiziert.

2.5 Sequenzierung der EcadEGFP Konstrukte im ABI-377

Um die Richtigkeit der zur Transfektion verwendeten Vektoren zu überprüfen, wurde eine Sequenzanalyse (Sequenzierung durch Kettenabbruch nach Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind unter „MATERIAL“ angegeben.

Cycle-PCR:

4	µl	Premix
0,5	µl	Primer [10 pmol]
1	µl	DMSO
X	µl	Template (10 -100 ng PCR-Produkt)
⇒	ad 20 µl H ₂ O (entionisiert)	

Die Cycle-PCR wurde in einem Thermocycler Primus 96^{plus} (MWG-Biotech) nach folgendem Protokoll durchgeführt.

96	°C	10 sek	} 25 Zyklen
55 - 60	°C	5 sek (Annealing-Temperatur vom Primer abhängig)	
60	°C	4 min	
4	°C	andauernd	

Nach der Cycle-PCR wurden die Proben mit Hilfe eines DyeEx™ Spin Kits über Säulen aufgereinigt und anschließend in einer Speedvac eingetrocknet. Die Proben wurden vor dem Sequenzieren in 2-4 µl Ladepuffer (50 mg/ml Blue Dextran in 25 mM EDTA, pH 8,0, im Verhältnis 1:5 mit deionisiertem Formamid gemischt) aufgenommen, 5 min bei 95°C denaturiert und 2 µl auf das Sequenziergel geladen.

Sequenziergel (0,5 long ranger Hydrolink Gel):

5	ml	Hydrolink
5	ml	10 x TBE
21	g	Harnstoff
⇒	ad 50 ml H ₂ O (bidest.)	
350	µl	10% APS
15	µl	TEMED

Die Gele liefen 3,5 h (Fragmente 300 – 400 bp) bzw. 7 h (Fragmente >400 bp). Die Sequenzen wurden anschließend mit der Vektor NTI Software (Suite 7, InforMax) ausgewertet.

2.6 Beschichtung von Kulturgefäßen mit Collagen I, Fibronectin, Vitronectin oder Poly-L-Lysin

Für die Versuche in der Inkubationskammer wurden Zellkulturpetrischalen mit Glasboden der Firma MatTek Corporation (Ashland, MA, USA) für 4 h mit Collagen I (100 µg/ml, Sigma, Deisenhofen) bei 37°C oder über Nacht bei 4°C mit Fibronectin (10 µg/ml, Sigma, Deisenhofen) oder Vitronectin (10 µg/ml, Becton-Dickinson, Bedford, USA) beschichtet. Für die Zell-Adhäsions-Experimente wurden 96-well Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden-Biebrich) über Nacht bei 4°C mit Poly-L-Lysin (150 µg/cm²), Collagen I (10 µg/cm²), Fibronectin (0,9 µg/cm²) oder Vitronectin (0,45 µg/cm²) beschichtet (alle Matrices wurden hierfür von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen).

2.7 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden in Gewebekulturflaschen oder Gewebekulturschalen bei 37°C / 5% CO₂ im Inkubator in Vollmedium (Dulbecco's DMEM, 10% (v/v) FCS, 2,5% (v/v) Penicillin/Streptomycin) kultiviert und alle 3-4 Tage passagiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit sterilem PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) wurden sie mit je 0,5 ml Trypsin/EDTA für 5 min im Inkubator abgelöst. Anschließend wurden die Zellen wieder in frischem Vollmedium aufgenommen und ein Aliquot davon in neue Gewebekulturflaschen oder Gewebekulturschalen überführt. Um den Verlust der transfizierten E-Cadherin cDNA zu verhindern, wurden Zellen mit G418 kultiviert. Da die transfizierten Zellen das Resistenzgen für das Gentamycin-verwandte Aminoglykosid G418 tragen, sollten nur diese überleben.

Einfrieren von Zellen:

Die Zellen wurden in Schalen (Ø 15 cm) ausgelegt und bis zur Konfluenz kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) wurden die Zellen mit je 0,5 ml Trypsin/EDTA für 5 min im Brutschrank abgelöst, in 10 ml Vollmedium aufgenommen und für 5 min bei 310g (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) resuspendiert. Die Zellen wurden auf 2-3 Einfrierröhrchen aufgeteilt, 1 h auf Eis inkubiert und bei -80°C eingefroren. Nach 2-3 Tagen wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff (-186°C) überführt.

2.8 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

MDA-MB-435S Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenz TransFast™ mit E-Cadherin-EGFP Konstrukten bzw. nur dem pEGFP-N2-Vektor stabil transfiziert. Hierfür wurden je $1,2 \times 10^6$ Zellen in Gewebekulturschalen (\varnothing 10 cm) in Vollmedium ausgesät. Das Transfektions-Reagenz wurde nach Herstellerangaben verdünnt und wieder bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden je 7,5 µg DNA von den Konstrukten und je 22,5 µl TransFast™-Reagenz in 6 ml Vollmedium aufgenommen, gemischt und bei RT für 15 min inkubiert. Die am Vortag ausgesäten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 1 h mit dem DNA / TransFast™-Gemisch im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden je 10 ml Vollmedium zu den Zellen pipettiert und es erfolgte eine weitere Inkubation ÜN. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und je 10 ml Vollmedium wurde zugegeben. Am dritten Tag nach der Transfektion wurden die transfizierten MDA-MB-435S Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, in 10 ml Vollmedium (+ Geneticin zur Selektion) aufgenommen und in neue Schalen (\varnothing 10 cm) überführt. Da auf dem pEGFP-N2 Vektor das Resistenzgen für das Gentamycin-verwandte Aminoglykosid G418 liegt, sollten nur transfizierte Zellen überleben. Für 2-3 Wochen erfolgte ein Mediumwechsel im Abstand von 3 Tagen, bis positive Klone anhand ihrer Fluoreszenz gepickt und in 12well Platten überführt werden konnten. Die Klone wurden als Einzelklone weiter kultiviert.

2.9 Selektion mit DynaBeads

Mit *wt*- bzw. *p8*-EcadEGFP-Plasmiden transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden unter Verwendung des *CELLection Pan Mouse IgG Kits* und eines Anti-E-Cadherin Antikörpers (HECD-1) auf positive, EcadEGFP exprimierende Zellen selektioniert.

DynaBeads mit HECD-1 Antikörper beladen:

20 μ l DynaBeads (= 8×10^6 Beads) wurden einmal mit 1 ml Waschpuffer (WB; 0,1% (v/v) BSA in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) unter Verwendung eines Magnetständers gewaschen und in 400 μ l WB aufgenommen. Nach Zugabe von 0,4 μ g Antikörper (HECD-1), welcher gegen E-Cadherin gerichtet ist, erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT auf dem Drehrad, wodurch der Antikörper über einen DNA-Linker an die Beads binden konnte. Die mit Antikörper-beladenen Beads wurden dreimal mit je 1 ml WB gewaschen und im Ausgangsvolumen von 20 μ l WB aufgenommen.

Selektion auf positive Zellen:

wt-EcadEGFP bzw. *p8*-EcadEGFP exprimierende Zellen wurden zweimal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen, mit Versene abgelöst und in je 10 ml Vollmedium aufgenommen. Je 2×10^6 Zellen wurden in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, 4 min bei 310g sedimentiert und zweimal mit je 1 ml WB gewaschen. Das Zellsediment wurde in 1 ml WB resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 20 μ l Antikörper-beladenen DynaBeads erfolgte eine 20-minütige Inkubation auf dem Drehrad bei 4°C, um die Bindung der E-Cadherin-positiven Zellen an den Antikörper zu ermöglichen. Unter Verwendung eines Magnetständers wurden die negativen Zellen von den positiven, an die Beads gebundenen Zellen getrennt und verworfen. Die positiven Zellen wurden dreimal mit je 1 ml WB gewaschen, in 400 μ l Vollmedium (37°C) aufgenommen und mit 10 μ l DNase (in dem Kit enthalten) 15 min auf dem Drehrad inkubiert (RT). Die DynaBeads wurden mit Hilfe eines Magnetständers von den Zellen getrennt. Die positiven, *wt*-EcadEGFP bzw. *p8*-EcadEGFP exprimierende Zellen wurden je in eine Gewebekulturschale mit Vollmedium überführt und die Einzelklone bei 37°C/5% (v/v) CO_2 kultiviert.

2.10 Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Die DNA-Isolierung aus Zellen wurde mit Hilfe des DNeasy Kits von QIAGEN durchgeführt. Für die Isolation wurden $3,5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Das Verfahren entsprach den Angaben des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch wie unter 2.2 beschrieben bestimmt.

2.11 Herstellung von Lysaten aus eukaryotischen Zellen

Lysispuffer:	140	mM	NaCl
	4,7	mM	KCl
	0,7	mM	MgSO ₄
	1,2	mM	CaCl ₂
	1	mM	Hepes, pH 7,4
frisch zugeben :	1	% (v/v)	Triton X-100
	2	mM	PMSF
	20	µg / ml	Leupeptin
	19	µg / ml	Aprotinin
	100	mM	NaF
	2	mM	Na ₃ VO ₄
	10	mM	Na ₄ P ₂ O ₇ x 10 H ₂ O

Zur Herstellung von Lysaten aus eukaryotischen Zellen wurde ein Protokoll verwendet, welches zur Aufrechterhaltung des E-Cadherin/Catenin Komplexes etabliert wurde (Cunningham *et al.*, 1984). Die Zellen wurden 2x mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, 37°C) gewaschen, 5 min im Kühlschrank mit Lysispuffer inkubiert und mit einem Zellschaber geerntet. Die Lysate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 10 min bei 14000 rpm (4°C) abzentrifugiert und die Überstände (Triton-lösliche Fraktion) in neue Reaktionsgefäße überführt. Das Sediment (Triton-unlösliche Fraktion) wurde verworfen. Der Gesamtproteingehalt wurde anschließend bestimmt.

2.12 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Biorad-Proteinreagenz (Biorad) durchgeführt. Die Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine und die damit verbundene Blaufärbung des Farbstoffes, die der Proteinkonzentration proportional ist. 5-10 µl Zellysat wurden mit 995-990 µl Biorad Reagenz, welches im Verhältnis 1:5 mit H₂O bidest. verdünnt wurde, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Das Biorad Reagenz enthält neben Coomassie Brilliant Blue G-250 Phosphorsäure und Methanol. Die Blaufärbung wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem UV/Vis Spectrophotometer DU® 530 (Beckman) gemessen und die Proteinmenge anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve quantifiziert.

2.13 Immunpräzipitation (IP)

200-1000 µg Gesamtprotein wurden pro Versuch eingesetzt, das Lysat mit Lysispuffer auf 1 ml aufgefüllt und 5 µg Primärantikörper zugegeben. Nach einer Inkubation über Nacht auf dem Drehrad (4°C) wurden 100 µl äquilibrierte Protein-A-Sepharose (für IP mit Anti-Maus-Antikörper) bzw. 100 µl äquilibriertes Pansorbin (für IP mit Anti-Kaninchen-Antikörper) dem Lysat zugefügt. Nach einer einstündigen Inkubation auf dem Drehrad (4°C) erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm (4°C). 70 µl des Überstandes wurden mit 30 µl 4xLadepuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Der restliche Überstand wurde verworfen. Die Protein-A-Sepharose Sedimente wurden dreimal mit je 900 µl Ovalbumin-NET-Puffer und zweimal mit je 900 µl NET-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand komplett verworfen, das Sediment in 70 µl 4xLadepuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert.

2.14 Nicht-radioaktiver Rac - Assay

Für die Bestimmung des Aktivitätszustandes von Rac1 in untransfizierten und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen wurde der nicht-radioaktive *Rac Activation Assay Kit* von Upstate Biotechnology verwendet. Einige Modifikationen des Firmenprotokolls wurden nach Schnelzer *et al.* (2000) vorgenommen. Rac1 ist nur in aktivierter Form (GTP-Rac) in der Lage, an die *p-21 activated Kinase 1* (PAK1), ein Mitglied der Rezeptortyrosinkinasen, zu binden. Deshalb wurde die Proteinbindedomäne von PAK1 (PBD, AS 67-150) als GST-Fusionsprotein verwendet, um aktiviertes Rac1 zu binden und mit Glutathion Sepharose 4B Beads aus dem Zelllysat zu präzipitieren. Die präzipitierte, aktivierte Form von Rac1 kann anschließend mittels Western-Blot-Analyse durch einen spezifischen Anti-Rac Antikörper nachgewiesen werden.

Lysispuffer:	50	mM	HEPES, pH 7,4
	150	mM	NaCl
	1	mM	EDTA, pH 8,0
	10	% (v/v)	Glycerin
	1	% (v/v)	Triton X-100
	10	µg/µl	Aprotinin
	10	µg/ml	Leupeptin
	1	mM	PMSF
	1	mM	Na ₃ VO ₄
	1	mM	NaF

Versuchsdurchführung:

6×10^5 parentale bzw. mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf unbeschichteten oder mit Collagen I beschichteten Schalen in 10 ml Vollmedium ausgesät und 5 h bei 37°C/5% (v/v) CO₂ kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS (+Ca²⁺, + Mg²⁺) gewaschen, mit einem Zellschaber geerntet und die Lysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach 6-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lysate 6 min bei 14000 rpm (4°C) zentrifugiert. Die Überstände (Triton-lösliche Fraktion) wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, das Sediment (Triton-unlösliche Fraktion) verworfen. 140 µg Gesamtprotein wurde für den Assay in einem Volumen von 500 µl eingesetzt. Den Ansätzen wurde je 7 µl der PAK1-PBD-Agarose (an Agarose gekoppelte PAK1 Bindedomäne) zugefügt und es erfolgte eine Inkubation für 1 h auf dem Drehrad im Kühlraum, um die Bindung von GTP-Rac an die PAK1-PBD-Agarose zu ermöglichen.

Assay-Kontrollen :

Um die Funktionalität des Assay zu überprüfen, wurden eine Positiv- und Negativkontrolle zusätzlich durchgeführt. Dabei handelte es sich um Lysat mit gleichem Gesamtproteingehalt wie bei den Proben. Das Lysat wurde zum einen mit GTP γ S (Positivkontrolle) und zum anderen mit GDP (Negativkontrolle) beladen. Da nur die Positivkontrolle an die PAK1-PBD binden kann, sollte in dieser Spur, nicht aber bei der Negativkontrolle ein GTP-Rac-Signal in der Western-Blot-Analyse detektierbar sein. Für die Kontrollen wurden gleiche Proteinmenge in einem Volumen von 500 μ l eingesetzt und mit je 1 μ l 0,5 M EDTA (pH 8,0) versetzt. Zur Positivkontrolle wurden 5 μ l 10 mM 100xGTP γ S (aus dem Kit) pipettiert. Dabei handelt es sich um ein GTP-Analogon, welches aufgrund seiner Struktur nicht hydrolysierbar ist. Für die Negativkontrolle wurde dem Ansatz 5 μ l 100 mM 100xGDP zugefügt. Die Kontrollen wurden 30 min bei 30°C inkubiert und mit 32 μ l 1 M MgCl₂ abgestoppt. Den beiden Ansätzen wurden je 7 μ l der PAK1-PBD-Agarose (an Agarose gekoppelte PAK1 Bindedomäne) zugefügt und es erfolgte eine Inkubation für 30 min auf dem Drehrad im Kühlraum. Die Ansätze wurden anschließend 1 min bei 14 000 rpm (4°C) zentrifugiert, je 70 μ l des Überstandes (enthält nicht-aktives, GDP-Rac1) mit 30 μ l 4xLadepuffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Sediment (enthält aktives, GTP-Rac1) wurde dreimal mit Lysispuffer gewaschen, in 10 μ l 4xLadepuffer resuspendiert und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden auf einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und Rac1 mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen.

2.15 Radioaktiver PI3-Kinase Assay

Um die Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) zu messen, wurde ein radioaktiver PI3-Kinase Assay durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Dr. Justus Duyster (III. Med. Klinik, Klinikum Rechts der Isar, München). In diesen Experimenten wurde die PI3-Kinase mittels Immunpräzipitation aus dem Zelllysate präzipitiert. Phosphatidylinositol (PI) sowie radioaktiv markiertes [γ ³³P] ATP wurden als Substrat für die PI3-Kinase eingesetzt. Durch die PI3-Kinase gebildetes, radioaktiv markiertes

Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) wurde anschließend mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Aktivität der Kinase anhand des radioaktiv-markierten Substrates bestimmt.

$1,6 \times 10^6$ Zellen wurden in großen Zellgewebekulturschalen (\varnothing 14 cm) ausgesät. Als Kontrolle wurden zusätzlich Zellen 2 min vor der Ernte mit EGF (100 ng/ml) stimuliert. 5 h nach dem Aussäen wurden die Zellen zweimal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Nach Zugabe von 5 ml Waschpuffer A (PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} /1mM Na_3VO_4) wurden die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig geerntet, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 3 min bei 310g (4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Das Zellsediment wurde auf Eis aufgetaut und die Zellen mit 1 ml Lysispuffer (Waschpuffer A / 1% (v/v) NP-40 / 1mM PMSF) 20 min auf Eis inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation (14000 rpm, 4°C) wurde der Überstand, der die PI3-Kinase enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt photometrisch bestimmt. Je Reaktionsansatz wurden 120 μg Gesamtprotein in einem Volumen von 500 μl eingesetzt. Nach Zugabe von je 30 μl Protein A Agarose Beads erfolgte ein *PreClear* für 20 min bei 4°C auf dem Drehrad. In diesem Schritt wurden Proteine, die unspezifisch an die Protein A Agarose Beads binden, entfernt.

In einer 3-minütigen Zentrifugation (14000rpm, 4°C) wurden die Beads sedimentiert und der Überstand, der die PI3-Kinase enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Je 2,5 μl Anti-p85 Antikörper (Upstate) wurden zugegeben und die Lysate 2 h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von je 40 μl Protein A Agarose Beads erfolgte eine weitere Inkubation für 1 h auf dem Drehrad (4°C). Die Beads, an welche die PI3-Kinase über den Antikörper gebunden worden war, wurden 2 min bei 14000 rpm (4°C) sedimentiert, dreimal mit Lysispuffer, dreimal mit Waschpuffer B (0,1 M Tris/HCl, pH 7,4, 5 mM LiCl, 0,1 mM Natrium-Orthovanadat) und zweimal mit TNE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 mM Na_3VO_4) gewaschen.

Um die Funktionalität des Assays zu überprüfen, wurde das Sediment in 50 μl TNE + 20 μM LY294002 resuspendiert. LY294002 ist ein spezifischer PI3-Kinase Inhibitor (Baumann and West, 1998). Das Sediment der Parallelansätze wurde in 50 μl TNE (+ entsprechende Menge an DMSO) resuspendiert, um DMSO-vermittelte Effekte ausschließen zu können. Als Substrat für die PI3-Kinase wurden 10 μl

Phosphatidylinositol (2 µg/µl) eingesetzt. Nach Zugabe von 10 µl 100 mM MgCl₂ wurden 5 µl des radioaktiven Mixes dem Ansatz zugefügt.

<u>Radioaktiver Mix:</u>	1	µl	100 mM MgCl ₂
	0,88	µl	5 mM ATP, nicht radioaktiv
	1,12	µl	H ₂ O bidest.
	2	µl	[γ ³³ p] ATP
			(0,88 mM ATP enthält 20 µCi [γ ³³ p] ATP, 2000 Ci pro mmol und 20 mM MgCl ₂)

Während der Inkubation für 10 min bei 37°C im Schüttler (1200 rpm) wurde das Substrat durch die aktive PI3-Kinase zu Phosphoinositol-3-Phosphat (PI3P) umgesetzt. Die Reaktion wurde mit 20 µl 6N HCl abgestoppt. 160 µl Chloroform/Methanol (1:1) wurden zugefügt und die Phasen durch Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT) getrennt. 50 µl der unteren Lipidphase wurden in einer Dünnschichtchromatographie (TLC) aufgetrennt. Der Laufpuffer bestand aus Chloroform/Methanol/H₂O/NH₄OH in einem Verhältnis von 43:38:7:5 (v/v). Zur Detektion der Banden wurde ein Röntgenfilm über Nacht aufgelegt.

2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Proteinauftrennung wurden Vertikalgele (SDS-PAGE nach Laemmli, 1970), die aus einem 5%igen Sammelgel und einem 7,5%igen, 10%igen oder 12,5%igen Trenngel bestanden, hergestellt. Die Zellysate wurden in Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese e bei 80-120 V in einer Minigelapparatur bei RT durchgeführt.

	Sammelgel	Trenngel		
	5%	7,5%	10%	12,5%
H ₂ O	2,85 ml	8,3 ml	7,34 ml	6,4 ml
Tris/HCl, pH 6,8	1,25 ml	---	---	---
Tris/HCl, pH 8,8	---	3,74 ml	3,74 ml	3,74 ml
40% Acrylamid	0,63 ml	2,8ml	3,75 ml	4,69 ml
20% 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

2.17 Western-Blot-Analyse

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden für 1 h bei 100 V in einer Nassblotkammer auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen transferiert. Freie Bindungsstellen der Membran wurden mit einer Blocklösung (je nach Antikörper entweder 2,5% Magermilchpulver/0,5% BSA in TBST oder 5% Magermilchpulver in TBST) für 2-3 h bei 4°C abgesättigt. Der jeweilige Primärantikörper wurde in der Blocklösung verdünnt und die Membran darin ÜN bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde der in der Blocklösung verdünnte Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper zugegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBST wurde die Membran mit einem Chemilumineszenzsubstrat für Western-Blot-Analysen (ECL™ *Western-Blotting-System*) für 1 min inkubiert. Zur Detektion der Banden wurden Röntgenfilme in unterschiedlichen Zeitabständen (1 sek bis ÜN) aufgelegt und anschließend entwickelt. Die Filme wurden eingescannt und mit dem Programm ScionImage (Version Beta 4.0.2, Scion Corporation) densitometrisch ausgewertet.

2.18 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Zelloberflächenantigene wurden in einem *Fluorescence-activated Cell Sorter* (FACS) gemessen. In diesen Versuchen wurden die Zelloberflächenantigene von einem primären Antikörper erkannt, an dem ein DTAF-markierter Sekundärantikörper gebunden wurde. Im FACS passieren die Zellen einen Laserstrahl, werden je nach Fluoreszenzintensität durch einen elektrischen Impuls aufgeladen, passieren ein elektrostatisches Feld und werden je nach Ladung abgelenkt, was sich in unterschiedlichen Signalen am Detektor auswirkt.

Für die Versuche wurden die Zellen zweimal mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und mit Versene (0,53 mM EDTA in PBS) von der Gewebekulturschale abgelöst. Nach Aufnahme in 10 ml Vollmedium und Überführung in ein 15 ml Falcon-Röhrchen wurden die Zellen 5 min bei 310g (4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Je FACS-Ansatz wurden 5-7x10⁵ Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, 3 min bei 310g abzentrifugiert und einmal mit 500 µl Waschpuffer (0,1% (w/v) Natriumazid,

0,1% (w/v) BSA) gewaschen. Das Sediment wurde in 50 μ l Primärantikörper-Lösung (verdünnt in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) resuspendiert und 45 min auf Eis inkubiert. Primärantikörper wurden in folgenden Konzentrationen verwendet (die Antikörper gegen Integrine wurden dem *Collagen-specific Integrins Investigator Kit* von Chemicon, Temecula, USA entnommen): α 1-Integrin: 4 μ g/ml; α 2-Integrin: 4 μ g/ml; α 3-Integrin: 4 μ g/ml, α v-Integrin: 4 μ g/ml; β 1-Integrin: 4 μ g/ml; β 3-Integrin: 4 μ g/ml; α v β 3-Integrin: 4 μ g/ml; IgG_{1, κ} : 4 μ g/ml; IgG_{2a, κ} : 4 μ g/ml; SHE78-7: 20 μ g/ml.

Die Zellen wurden zweimal mit je 500 μ l Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit einem DTAF-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Konzentration von 20 μ g/ml (50 μ l, verdünnt in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) abgedunkelt auf Eis. Nach zweimaligem Waschen in je 500 μ l Waschpuffer wurden die Zellen in 500 μ l Waschpuffer resuspendiert und im Durchflusszytometer (FACS EPICS[®] XL, Beckmann Coulter, Krefeld) gemessen. Die Ergebnisse wurden in das Programm WinMDI (Version 2.8) importiert, dort graphisch dargestellt, die Abbildungen in das Adobe PhotoShop Programm exportiert und nachbearbeitet.

2.19 Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern

2×10^6 Zellen wurden in 6well Platten auf Deckgläschen in Vollmedium ausgesät und für 2-3 Tage bei 37°C/5% (v/v) CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS (+Ca²⁺, + Mg²⁺) gewaschen und je nach Primärantikörper entweder 5 min mit Methanol (-20°C) oder 30 min mit 4% (v/v) Formaldehyd bei RT fixiert. Die mit Formaldehyd inkubierten Zellen wurden zusätzlich 30 sek mit Aceton (-20°C) permeabilisiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und mit dem Primärantikörper 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit einem DTAF-markierten Sekundärantikörper lichtgeschützt für 1 h inkubiert, zweimal mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) und einmal mit H₂O demin. gewaschen. Die Deckgläschen wurden auf Objekträger mit einem Tropfen Antifade überführt und mit Pertex eingedeckt, um eine längere Haltbarkeit der Fluoreszenzintensität zu gewähren. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.20 Immunfluoreszenzfärbung mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin

Intrazelluläre β -Aktinfilamente wurden mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin nachgewiesen. 2×10^4 Zellen wurden in 6well Platten auf Deckgläschen in Vollmedium ausgesät und für 2-3 Tage bei $37^\circ\text{C}/5\%$ (v/v) CO_2 kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS ($+\text{Ca}^{2+}$ und Mg^{2+}) gewaschen, 30 min mit 4% (v/v) Formaldehyd bei RT fixiert und 30 sek mit Aceton (-20°C) permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen 2 h mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin [0,125 $\mu\text{g}/\text{ml}$] lichtgeschützt bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) und einmaligem Waschen mit H_2O demin. wurden die Deckgläschen auf Objektträger mit einem Tropfen Antifade überführt und mit Pertex eingedeckt, um längere Haltbarkeit zu gewähren. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.21 Zell-Matrix-Adhäsions-Assay

96-well Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden-Biebrich) wurden über Nacht bei 4°C mit Poly-L-Lysin ($150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Collagen I ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Fibronectin ($0,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) oder Vitronectin ($0,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet (alle Matrices wurden von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen). Die Zellen wurden mit Versene von der Gewebekulturschale abgelöst, um die Zelloberflächenmoleküle nicht abzuspalten. Je 10^4 Zellen pro Well wurden auf den unterschiedlich beschichteten 96-well Mikrotiterplatten in je 100 μl DMEM ohne FCS ausgesät und 20 min bei $37^\circ\text{C}/5\%$ (v/v) CO_2 inkubiert, um zu adhären. Anschließend wurden nicht-adhärenente Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) entfernt. Zu den restlichen Zellen wurde frisches Vollmedium gegeben und die Zell-Vitalität mittels eines XTT-Zellproliferations- und Vitalitätsassays (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) bestimmt. 50 μl XTT markierter Mix wurde in jedes Well pipettiert. Lebende, metabolisch aktive Zellen spalten das Tetrazolium Salz XTT, wodurch ein Formazan-Farbstoff gebildet wird. Dieser Farbstoff kann anschließend spektralphotometrisch mittels eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)-Readers bei einer Absorption von 450 nm gemessen werden. Der bei Anwesenheit von Medium ohne Zellen gemessene Wert galt als Leerwert und wurde von den bei

Anwesenheit von Zellen erhaltenen Werten subtrahiert. Für jedes Experiment wurde ein vierfacher Ansatz durchgeführt.

2.22 Migrationsexperimente in der Inkubationskammer

Die Motilität der Zellen und die Lokalisation von EGFP-markierten E-Cadherin während der Zellbewegung wurden mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 100 M mit angeschlossenen Zeiss CTI Controller als CO₂-Inkubationssystem und einem beheizbaren Mikroskoptisch mit Lufttemperierung untersucht (Abb. 25). Das Mikroskop und die Software wurden freundlicherweise von Herrn Dr. P. Hutzler (GSF, Institut für Pathologie, Neuherberg) zur Verfügung gestellt.

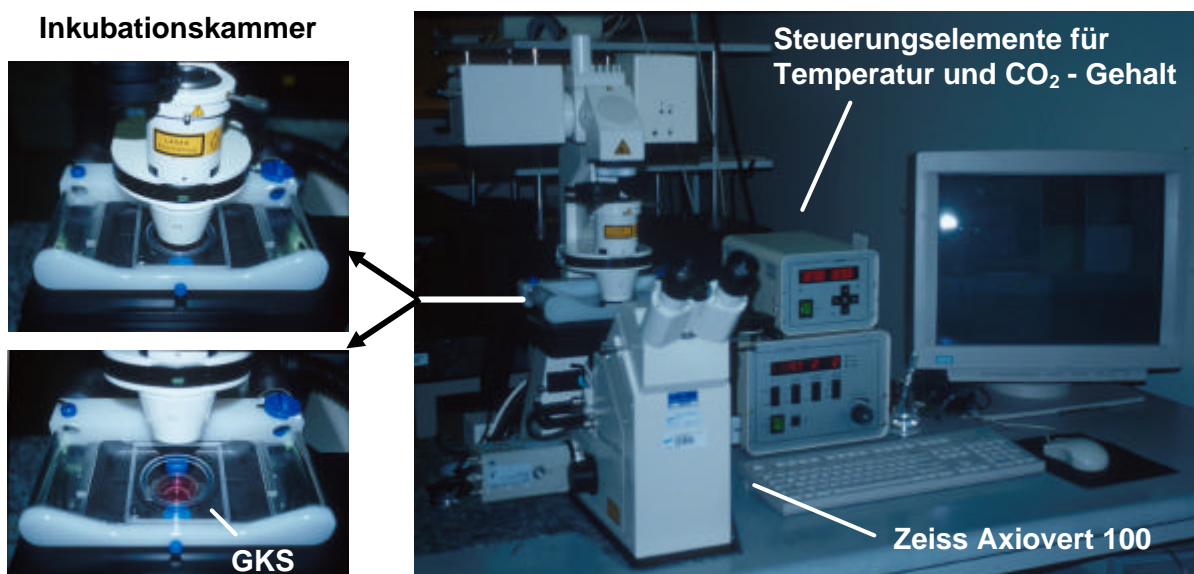


Abb. 25: Für *in vitro*-Versuche: Zeiss Axiovert 100 M mit angeschlossenen Zeiss CTI Controller als CO₂-Inkubationssystem und einem beheizbaren Mikroskoptisch mit Lufttemperierung, Inkubationskammer mit Gewebekulturschälchen mit Glasboden (GKS)

2.22.1 Zell-Motilitäts-Versuche mit unmarkierten MDA-MB-435S Zellen

Je 2×10^5 Zellen wurden in Gewebekulturschälchen mit Glasboden (Firma MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) ausgesät. Die Schälchen wurden entweder unbeschichtet oder mit Poly-Lysin beschichtet von der Firma MatTek Corporation

bezogen. Unbeschichtete Schalen wurden für 4 h mit Collagen I (100 µg/ml, Sigma, Deisenhofen) bei 37°C oder über Nacht bei 4°C mit Fibronectin (10 µg/ml, Sigma, Deisenhofen) oder Vitronectin (10 µg/ml, Becton-Dickinson, Bedford, USA) beschichtet. Kinase-Inhibitoren wurden in einer Endkonzentration von 50 µM (PD98059; Sigma, Deisenhofen), 40 µM (LY294002; Calbiochem, Schwalbach) oder 6,3 µM (Tyrphostin AG1478; Sigma, Deisenhofen) zugegeben. Der Wachstumsfaktor EGF wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt.

Aufnahmen wurden in drei Minuten Intervallen mit einem Axiovert Laser Scanning Mikroskop LSM 510 (Zeiss) mit einem PNF 20x/0,4 PH2 Objektiv und einem Helium-Neon Laser bei 543 nm als Phasenkontrast im Transmissionsmodus aufgenommen. Der Prozentsatz an motilen Zellen wurde wie folgt bestimmt: der Zellrand einzelner Zellen wurde umrandet und jede Zelle, die während des Beobachtungszeitraumes von 7 h diesen Ursprungsort vollständig verlassen und sich nicht geteilt hat, wurde als motil bezeichnet. Die zurückgelegten Wegstrecken von 60 zufällig ausgewählten Zellen (aus drei Filmsequenzen) wurden über 7 h mittels der LSM 510 Software in einer Overlay-Ebene interaktiv nachgezeichnet. Die Zellgeschwindigkeit ließ sich anhand der Division der zurückgelegten Strecke durch die dazu benötigte Zeit berechnen.

2.22.2 Versuche mit EcadEGFP exprimierenden MDA-MB-435S Zellen

Je 1×10^5 Zellen (mit *wt*-EcadEGFP bzw. *p8*-EcadEGFP cDNA transfiziert) wurden einen Tag vor jeder Beobachtungsserie in 3 ml Medium (Vollmedium bzw. Hungermedium) auf Collagen I beschichteten Gewebekulturschälchen mit Glasboden (Firma MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) ausgesät. Am Untersuchungstag wurde das Medium erneuert und die Zellen mit Tyrphostin (6,3 µM) bzw. EGF (100 ng/µl) 30 min bis 2 h in der Inkubationskammer inkubiert, bevor die Erfassung der Zeitsequenz gestartet wurden. In der Inkubationskammer lagen optimale Kultivierungsbedingungen für die Zellen vor (37°C/5% (v/v) CO₂). Für die Aufnahmen der EcadEGFP-Verteilung und die Migration der Zellen wurde ein 63x1,25, Öl / Ph3 Objektiv verwendet. Es wurden simultan Phasenkontrastbilder in Transmission und Fluoreszenzbilder in Reflexion mit einem Emissionsfilter von 505 nm (*Longpass*-Filter) unter Verwendung eines Argon-Lasers (Anregung bei

488 nm) aufgenommen. Die Erfassung der Zeitserie über einen Zeitraum von 4-8 h in einem Abstand von 2-3 min wurde über die LSM 510 Software (Zeiss) gesteuert. Die zurückgelegten Wegstrecken von 10 zufällig gewählten Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 h mittels der LSM 510 Software in einer Overlay-Ebene interaktiv nachgezeichnet, die Anfangspunkte der Wanderungstrecken in einem gemeinsamen Startpunkt zusammengefasst, die Abbildung in das Adobe PhotoShop Programm exportiert und dort bearbeitet. Zur Darstellung der Zellmorphologie und der E-Cadherin-Verteilung während der Zellbewegung wurden aus den Filmen je 9 Bilder im Abstand von je 24 min ausgewählt, mit der KS-Software der Firma Zeiss nachbearbeitet und im Adobe Illustrator Programm als Galerie abgebildet.

2.23 Mikroinjektion

2×10^4 Zellen wurden in 6well Platten auf CELLocate Coverslips (Eppendorf) in Vollmedium ausgesät und 2-3 Tage bei 37°C, 5% (v/v) CO₂ kultiviert. 3 h vor der Injektion wurden die CELLocate Coverslips in Ø 3 cm Gewebekulturschalen mit 3 ml Vollmedium überführt und bei 37°C / 5% (v/v) CO₂ weiter kultiviert. Die Mikroinjektionsexperimente wurden mit Hilfe eines Transjector 5246 (mit InjectMan; Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

Injektionslösung (15 µl):

500 ng/µl L61Rac1 bzw. N17Rac1
300 ng/µl FITC-Dextran (Sigma, Deisenhofen)
in PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺)

Die Injektionslösung wurde vor Verwendung 15 min bei 14000 rpm (4°C) zentrifugiert, um kleinste Teilchen, welche die Injektionskapillare (Femtotip[®] Typ II) verstopfen könnten, zu sedimentieren. 4 µl der Injektionslösung wurden mit Hilfe eines *Microloaders* in die Injektionskapillare (Femtotip[®] Typ II) überführt. Die Mikroinjektion wurde mit einem Injektionsdruck von 150 hPa und einer Injektionszeit von 0,3 s durchgeführt. FITC-Dextran diente als Injektionskontrolle. Nach der Injektion wurden die Zellen 1-2 h im Inkubator (37°C/5% (v/v) CO₂) kultiviert und

anschließend eine Immunfluoreszenz mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin durchgeführt, um eine Veränderung der intrazellulären β -Aktinfilamente-Verteilung nachzuweisen.

2.24 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Allgemeine molekularbiologische Methoden, die in dieser Arbeit verwendet, jedoch nicht weiter beschrieben wurden (Isopropanolfällung, Ethanol-fällung, etc.), wurden nach Sambrock *et al.* (1989) bzw. nach Angaben der jeweiligen Produkthersteller durchgeführt.

2.25 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dipl. Math. R. Busch (Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie) durchgeführt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurden in dem Programm SPSS (Version 11.5) mit verschiedene Tests berechnet: Mann-Whitney-Test, T-Test, *Oneway* Varianz-Analyse, Kruskal Wallis Test. Im Ergebnisteil ist bei den Versuchen angegeben, welcher Test angewandt wurde.

D ERGEBNISSE

I. Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die Motilität von MDA-MB-435S Karzinomzellen

Das kalzium-abhängige, homophile Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin liegt in diffusen Magenkarzinomen in fast 50% der untersuchten Fälle in mutierter Form vor, wobei ein kompletter Verlust des Exons 8 (*del8*) oder des Exons 9 (*del9*) gehäuft und eine Punktmutation im Exon 8 (D370A, *p8*) einmal auftraten (Becker *et al.*, 1994). Diese Mutationen sind vor allem in einer so genannten Hot-Spot-Region im E-Cadherin-Gen lokalisiert, d.h. die meisten E-Cadherin-Mutationen findet man im Bereich des Exons 8 und des Exons 9 (Berx *et al.*, 1998). Bei den Deletions-Mutationen handelt es sich um *in frame* Deletionen. *In vitro* Studien mit humanen MDA-MB-435S Karzinomzellen, die stabil mit *wt*- bzw. mutiertem E-Cadherin transfiziert worden waren, zeigten einen Mutations-abhängigen E-Cadherin-Einfluss sowohl auf die Morphologie, als auch auf das Migrationsverhalten der Zellen (Handschuh *et al.*, 1999, Lubber *et al.*, 2000). *wt*-E-Cadherin exprimierende Zellen zeichneten sich durch einen epithelialen und wenig motilen Phänotyp aus. E-Cadherin Moleküle waren an den Zellkontaktstellen lokalisiert. Im Gegensatz zur Expression von *wt*-E-Cadherin führte die Expression von mutiertem E-Cadherin morphologisch zu einer epithelialen zu mesenchymalen Transition, wobei die Zelladhäsion abnahm und die Motilität der Zellen anstieg. Mutiertes E-Cadherin war an den Zellrändern und verstärkt perinukleär lokalisiert. Von Handschuh *et al.* (1999) durchgeführte *in vitro* Wundheilungs-Versuche zeigten, dass sich Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimierten, im Vergleich zu *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen durch ein erhöhtes Migrationsverhalten auszeichnen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in weiterführenden Experimenten in vorliegender Arbeit durch den Einsatz einer Temperatur- und CO₂-geregelten Inkubationskammer den Fragen nachgegangen, ob es Unterschiede im Motilitätsverhalten der Zellen innerhalb eines Klonen gibt, die durch mutiertes E-Cadherin erhöhte Zellmotilität von Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst wird und die erhöhte Migrationsfähigkeit durch Inhibition motilitätsrelevanter Signalwege blockiert werden kann (Fuchs *et al.*, 2002). Nach Herstellung von E-Cadherin-EGFP (EcadEGFP) Konstrukten und stabiler Expression in MDA-MB-435S Zellen wurde

erstmals die räumliche und zeitliche Verteilung von mutiertem E-Cadherin nach Applikation von Inhibitoren des EGF-Rezeptors (Tyrphostin AG1478) und der PI3-Kinase (LY294002) bzw. des Wachstumsfaktors EGF *in vitro* während der Zellbewegung untersucht. Weiterhin gaben FACS-Analysen Aufschluss über die Rolle Collagen-spezifischer Integrine in der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität.

1. Mutiertes E-Cadherin erhöht die Motilität von MDA-MB-453S Zellen im Vergleich zu *wt*-E-Cadherin

Die Motilität einzelner, untransfizierter oder mit E-Cadherin transfizierter MDA-MB-435S Zellen (*wt*, *del 9*, *del 8* und *p8*) wurde mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 100 M Laser-Scanning-Mikroskops mit angeschlossenem Zeiss CTI *Controller* als CO₂-Inkubationssystem und einem beheizbaren Mikroskoptisch mit Lufttemperierung analysiert. Die Zellen wurden für diese Versuche auf mit Collagen I beschichteten Zellkulturpetrischalen mit Glasboden ausgesät und 2 h bei 37°C/5% (v/v) CO₂ kultiviert. Phasen-Kontrast-Bilder wurden im Abstand von je 3 min über einen Zeitraum von 7 h aufgenommen und die Auswertung der motilen Zellen nach der Methode von Marks *et al.* (1991) durchgeführt. Als motil definierten die Autoren Zellen, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes ihren Ursprungsort vollständig verlassen und sich nicht geteilt haben und bis zum Ende des Experimentes vital waren. Die Ergebnisse von je 60 Zellen pro Klon aus drei unabhängigen Analysen wurden in die Auswertung einbezogen.

Wie in Abb. 26 dargestellt unterschieden sich die verschiedene Zelllinien signifikant in ihrer Motilität ($p=0,003$; *Oneway* Varianz-Analyse). Untransfizierte (30%) und mit *wt*-E-Cadherin transfizierte Zellen (26%) zeichneten sich im Vergleich zu Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimierten (*del 9*: 52%; *del 8*: 58%; *p8*: 45%), durch geringere Motilität aus. Die Expression von mutiertem E-Cadherin führt somit in MDA-MB-435S Zellen zu einer deutlichen Motilitätserhöhung. Dieses Ergebnis korreliert weitgehend mit den Resultaten, die von Handschuh *et al.* (1999) durch *in vitro* Wundheilungs-Experimente erhalten worden waren. Allerdings wurde in Handschuh *et al.* (1999) eine deutlich höhere Motilität für parentale MDA-MB-435S

Zellen im Vergleich zu *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen beschrieben, was in den unterschiedlich verwendeten Methoden begründet sein kann.

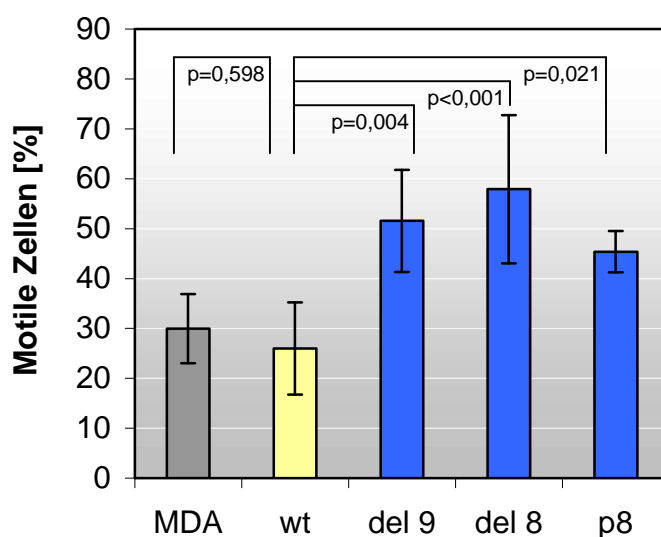


Abb. 26: Mutiertes E-Cadherin erhöht die Motilität von MDA-MB-435S Zellen im Vergleich zu *wt*-E-Cadherin

Je 2×10^5 untransfizierte oder mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf mit Collagen I beschichteten Zellkulturpetrischalen mit Glasboden ausgesät und 2 h bei $37^\circ\text{C}/5\%$ (v/v) CO_2 kultiviert. Phasenkontrastbilder wurden alle 3 min über einen Zeitraum von 7 h mit einem Laser-Scanning-Mikroskop 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 wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die Balken stellen den Mittelwert \pm der Standardabweichung dar. Die statistische Auswertung wurde mit der *Oneway* Varianz-Analyse durchgeführt. Berechnet wurde die Signifikanz des Unterschiedes der Motilität *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien.

Um eine gesicherte Aussage über die Zellgeschwindigkeit einer gesamten Population zu erhalten, ist es notwendig, eine große Anzahl an Zellen zu untersuchen (Hartmann-Peterson, 2000). Zur Ermittlung der Wanderungsgeschwindigkeit individueller MDA-MB-435S Zellen, welche kein bzw. *wt*- oder mutiertes E-Cadherin exprimierten, wurde die Mitte des Zellkerns markiert und die innerhalb des Beobachtungszeitraumes zurückgelegte Wegstrecke in einer Overlay-Ebene interaktiv nachgezeichnet. Anschließend wurde die Zellgeschwindigkeit pro Stunde berechnet. Je 60 zufällig ausgewählte Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten berechnet. Der Bereich zwischen der minimalen und der maximalen Zellgeschwindigkeit sowie der Median der Zellgeschwindigkeit wurden als Motilitätsparameter gewählt.

Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimierten, zeichneten sich durch eine größere Spannbreite mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten aus und erreichten im Vergleich zu *wt*-E-Cadherin exprimierenden und parentalen MDA-MB-435S Zellen höhere Maximalgeschwindigkeiten (MDA: 3,4-46,6 $\mu\text{m}/\text{h}$; *wt*: 1,2-20,8 $\mu\text{m}/\text{h}$; *del 9*: 3,0-58,1 $\mu\text{m}/\text{h}$; *del 8*: 4,6-53,0 $\mu\text{m}/\text{h}$; *p8*: 3,6-59,5 $\mu\text{m}/\text{h}$) (Abb.27). Der Median der Zellgeschwindigkeiten lag bei mit mutiertem E-Cadherin transfizierten Zellen sowie parentalen MDA-MB-435S Zellen höher als bei *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen (MDA: 10,4 $\mu\text{m}/\text{h}$; *wt*: 7,0 $\mu\text{m}/\text{h}$, *del 9*: 10,4 $\mu\text{m}/\text{h}$; *del 8*: 16,0 $\mu\text{m}/\text{h}$; *p8*: 10,7 $\mu\text{m}/\text{h}$) (Abb. 28; $p < 0,001$; Kruskal Wallis Test)..

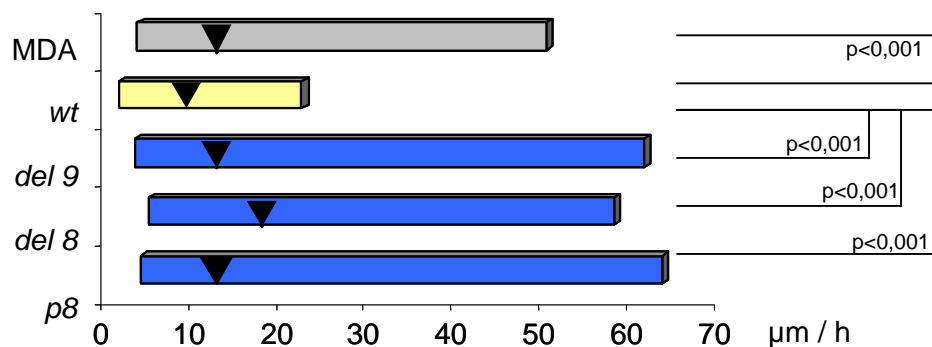


Abb. 27: Verteilung der Zellgeschwindigkeiten in Abhängigkeit vom E-Cadherin-Status

Der Versuch wurde wie unter Abbildung 27 beschrieben durchgeführt. Zur Ermittlung der zurückgelegten Wegstrecke der individuellen Zellen wurden die Zentren der Zellkerne mittels der LSM 510 Software von Zeiss halbautomatisch markiert und über den Beobachtungszeitraum von 7 h verfolgt. Die Zellgeschwindigkeit der einzelnen Zellen wurde aus der zurückgelegten Wegstrecke dividiert durch die Aufnahmezeit berechnet und als Zellgeschwindigkeit in [$\mu\text{m}/\text{h}$] angegeben. Die Balken repräsentieren den Bereich zwischen der minimalen und maximalen Geschwindigkeit der untersuchten 60 Zellen der verschiedenen Zelllinien. Mit Dreiecken markiert sind die Mediane der Zelllinien. Die statistische Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt. Berechnet wurde die Signifikanz des Unterschiedes der Motilität *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die Expression von *wt*-E-Cadherin im Vergleich zu mutiertem E-Cadherin in MDA-MB-435S Zellen den Median der Zellgeschwindigkeit einer Zellpopulation herabsetzt. Dafür verantwortlich sind u.a. vermehrt ausgebildete Zell-Zell-Kontakte, welche der Migration entgegenwirken.

2. Rolle von EZM-Proteinen in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität

2.1 Einfluss von EZM-Proteinen auf die Adhäsion und Migration

Für die Migrationsfähigkeit einer Zelle spielen nicht nur intrazelluläre, sondern auch extrazelluläre Faktoren eine wichtige Rolle. Hierbei nehmen die Extrazellulären Matrixproteine (EZM-Proteine) eine bedeutende Stellung ein. Das Zusammenspiel von Migration und Adhäsion ist allerdings ein komplexer Vorgang. Paleck *et al.* (1997) zeigten, dass die Zellmigration von der Adhäsion abhängig ist, d.h. eine Migration der Zellen weder bei einer zu starken noch zu schwachen Adhäsion möglich ist. Deshalb wurde die Motilität und Adhäsion der mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen auf verschiedenen Matrices (Poly-Lysin, Collagen I, Fibronektin und Vitronektin) untersucht, um optimale Bedingungen für weitere Versuche zu erhalten. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden exemplarisch zwei Zelllinien ausgewählt: eine wenig motile, *wt*-E-Cadherin exprimierende und eine hoch motile, *del8*-E-Cadherin exprimierende Zelllinie.

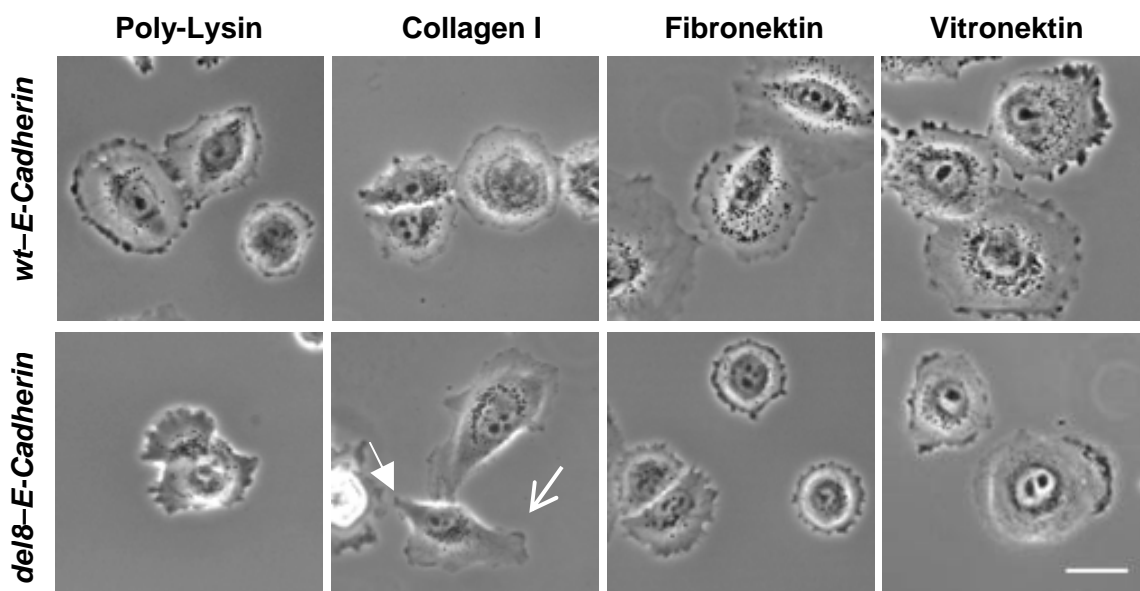


Abb. 28: Einfluss verschiedener Matrices auf die Zellmorphologie

Je 2×10^5 *wt*- bzw. *del8*-E-Cadherin exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden auf Zellkulturpetrischalen mit Glasboden ausgesät, welche mit Poly-Lysin, Collagen I, Fibronektin oder Vitronektin beschichtet worden waren. Phasenkontrastbilder wurden nach einer Kultivierung von 2 h bei 37°C/5% (v/v) CO₂ mit einem Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Bilder der Zelllinien auf unterschiedlichen Matrices. Die abgebildeten Phänotypen waren auch nach mehreren Stunden detektierbar. Mit Pfeilen markiert sind Lamellipodien (Pfeil mit offener Spitze) und die Retraktionsfaser (Pfeil mit geschlossener Spitze). Der Balken entspricht 25 µm.

Morphologisch waren sich *wt*- und *del8*-E-Cadherin exprimierende Zellen, die auf Poly-Lysin, Fibronektin oder Vitronektin ausgesät worden waren, sehr ähnlich (Abb. 28). Sie wiesen alle eine rundliche Zellform auf, wobei die mit *wt*-E-Cadherin transfizierten Zellen ausgebreiteter erschienen. Im Gegensatz dazu zeichneten sich *del8*-E-Cadherin exprimierende Zellen auf Collagen I durch den für migrierende Zellen charakteristischen Phänotyp aus, d.h. die Zellen waren durch Lamellipodien am Leitsaum und Retraktionsfasern charakterisiert (Abb. 28).

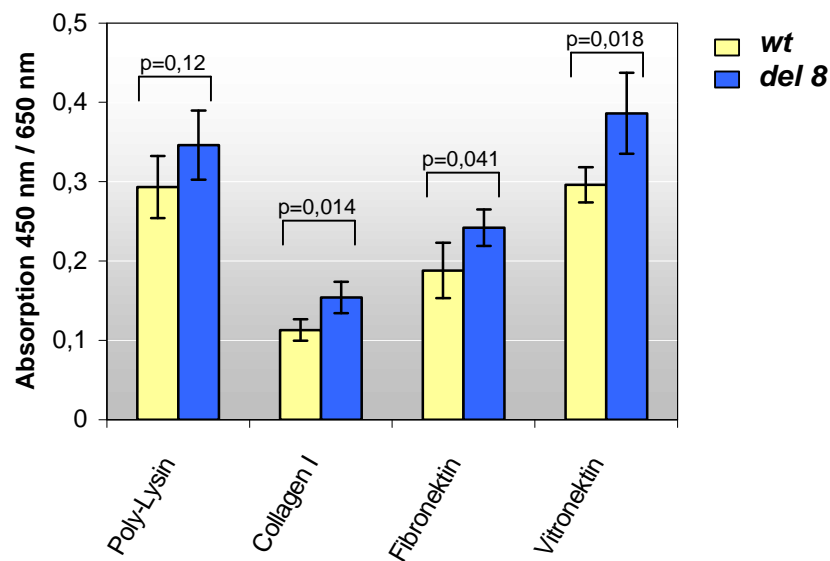


Abb. 29: Adhäsion auf verschiedenen Matrices

Je 10^4 *wt*- bzw. *del8*-E-Cadherin exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden in 96well Platten, die entweder mit Poly-Lysin ($150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Collagen I ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Fibronektin ($0,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) oder Vitronektin ($0,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet worden waren, in DMEM ohne FCS ausgesät. Nach einer Kultivierung von 20 min bei $37^\circ\text{C}/5\%$ (v/v) CO_2 wurden nicht adhärenente Zellen mit PBS gewaschen. Die lebenden, adhärenenten Zellen wurden mittels eines XTT-Zellproliferations- und Vitalitäts-Assays bestimmt. Vierfachbestimmungen wurden durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen wurde ausgewählt. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm der Standardabweichung dar. Die statistische Auswertung der Adhäsion beider Zelllinien zu einer Matrix im Vergleich wurde mit dem T-Test durchgeführt.

Zur Bestimmung der Adhäsionsstärke zu verschiedenen EZM-Proteinen wurden MDA-MB-435S Zellen, die *wt*- oder *del8*-E-Cadherin exprimierten, auf Zellkulturschalen, die entweder mit Poly-Lysin, Collagen I, Vitronektin oder Fibronektin beschichtet worden waren, ausgesät. Nach 20-minütiger Inkubation wurden nicht adhärenente Zellen gewaschen und vitale, adhärenente Zellen mittels eines kommerziellen XTT-Zellproliferations-Vitalitäts-Assays bestimmt. Es zeigte sich, dass die Zelladhäsion auf Poly-Lysin und Vitronektin in beiden Zelllinien stärker als auf Collagen I und Fibronektin war (Abb. 29; $p < 0,001$; Oneway Varianz-Analyse).

Auf Collagen I waren sowohl *wt*- als *del8*-E-Cadherin exprimierende Zellen am wenigsten in der Lage, innerhalb der 20-minütigen Inkubationszeit zu adhären.

Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, welcher Zusammenhang zwischen der Adhäsion und der Motilität auf den unterschiedlichen Matrices besteht. Die Versuche wurden wie unter Punkt I.1 beschrieben (S. 74) durchgeführt. Die Experimente ergaben eine inverse Korrelation zwischen der Zellmotilität und der Zell-Matrix-Adhäsion, d.h. bei starker Adhäsion war die Migrationsfähigkeit der Zellen äußerst gering. Die Motilität ist jedoch nicht nur von äußeren, sondern auch von Zell-spezifischen Faktoren abhängig ist. Dies konnte in Versuchen auf Collagen I nachgewiesen werden. Während sich die Motilität *wt*-E-Cadherin exprimierender MDA-MB-453S Zellen auf den verschiedenen Matrices nicht signifikant unterschied ($p=0,125$; *Oneway* Varianz-Analyse), zeichneten sich Zellen, die mit *del8*-E-Cadherin transfiziert worden waren, durch eine signifikante Erhöhung motiler Zellen aus (Abb. 30; $p=0,0004$; *Oneway* Varianz-Analyse). Dieses Ergebnis führt zu dem Schluss, dass EZM-Bedingungen das migratorische Verhalten E-Cadherin exprimierender MDA-MB-435S Zellen beeinflussen. Die Zellmigration wird somit nicht nur durch ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte, sondern auch durch starke Zell-Substrat-Interaktionen reduziert.

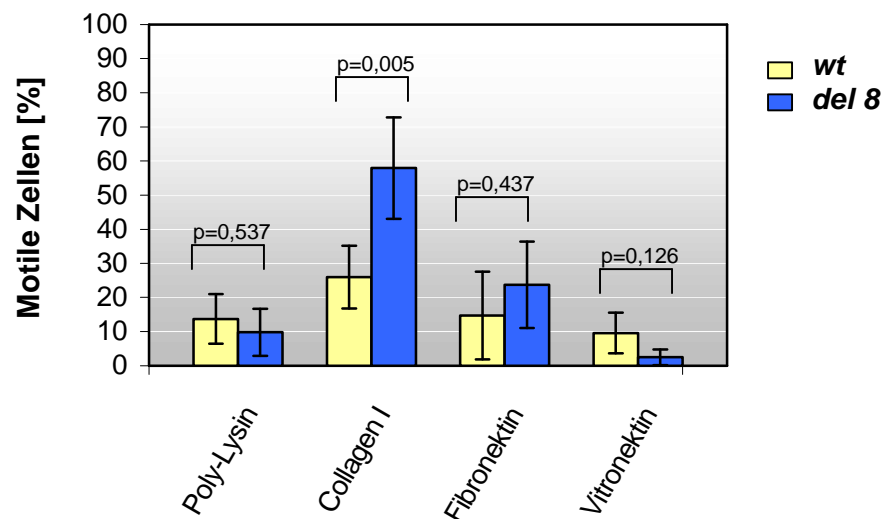


Abb. 30: Die Motilität E-Cadherin-transfizierter Zellen ist von der extrazellulären Matrix abhängig

Je 2×10^5 untransfizierte oder mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf Zellkulturpetrischalen mit Glasboden, die mit Poly-Lysin, Collagen I ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Fibronectin ($0,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) oder Vitronectin ($0,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet worden waren, ausgesät und 2 h bei $37^\circ\text{C}/5\%$ (v/v) CO_2 kultiviert. Die Motilität der Zellen wurde wie in Abb. 27 beschrieben bestimmt. Jeder Balken präsentiert den Mittelwert \pm der Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung der Adhäsion beider Zelllinien zu einer Matrix im Vergleich wurde mit dem T-Test durchgeführt.

2.2 Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die Expression Collagen-spezifischer Integrine

Integrine stellen die größte und z.Zt. am besten charakterisierte Gruppe extrazellulärer Matrix-Rezeptoren dar. Sie sind in den Mechanismus der Zellbewegung und Invasion involviert. Die Detektion der auf Collagen I erhöhten Motilität von MDA-MB-435S Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimierten, im Gegensatz zu untransfizierten oder mit *wt*-E-Cadherin transfizierten Zellen (Fuchs *et al.*, 2002), warf die Frage auf, welche Collagen-spezifischen Rezeptoren in diesen Zelllinien exprimiert werden. Eine unterschiedliche Integrin-Expression kann für die erhöhte Motilität der Mutanten von Bedeutung sein. Fünf Collagen-spezifische Integrinuntereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, αv und $\beta 1$) und ein Integrinheterodimer ($\alpha v\beta 3$) wurden mittels FACS-Analyse untersucht. Mindestens drei Experimente wurden für jedes Integrin durchgeführt und zusätzlich ein zweiter Klon je Mutationsstatus verwendet.

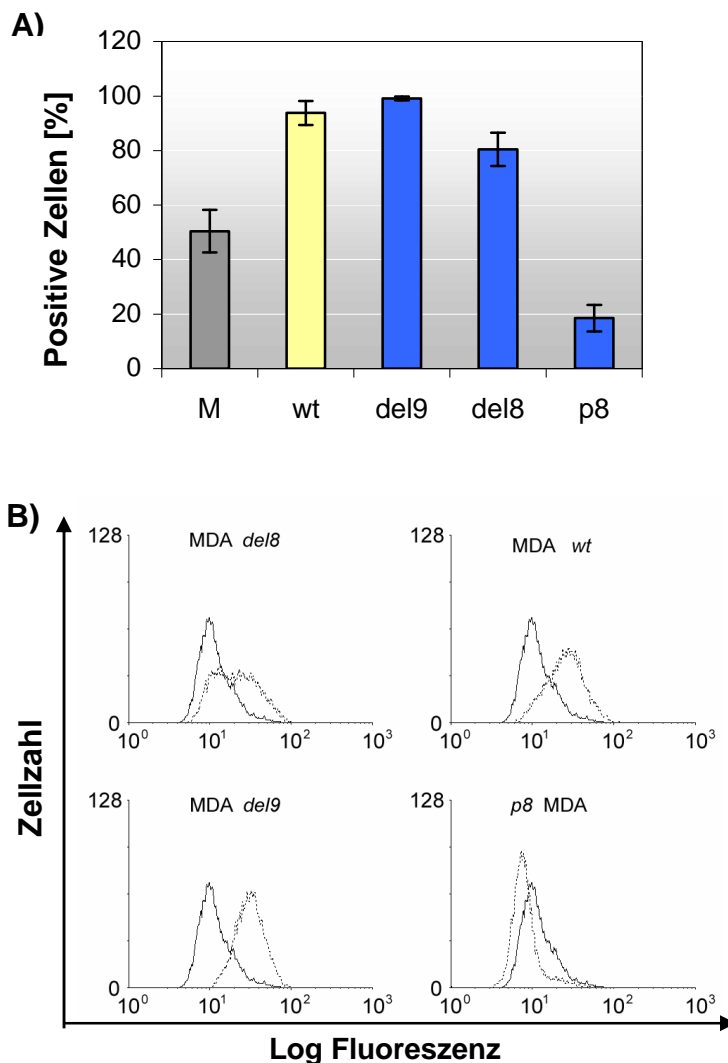


Abb. 31: Messdaten der FACS-Analyse: Nachweis der Expression von $\alpha v\beta 3$ -Integrin

Je 6×10^5 untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden 1 h mit dem entsprechenden Primärantikörper (Maus IgG_{1,k} als Isotypenkontrolle bzw. $\alpha v\beta 3$, Konzentration je 4 $\mu\text{g/ml}$) auf Eis inkubiert, gewaschen und 45 min mit dem Sekundärantikörper (DTAF, Konzentration: 20 $\mu\text{g/ml}$) abgedunkelt auf Eis inkubiert.

A: Als positive, $\alpha v\beta 3$ -Integrin exprimierende Zellen wurden diejenigen Zellen gewertet, welche in dem 1%-Intervall der Isotypenkontrolle lagen. Jeder Balken präsentiert den Mittelwert \pm der Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

B: Ein repräsentatives FACS-Ergebnis wurde ausgewählt. Durchgezogene Linie: parentale MDA-MB-435S Zellen (MDA). Mit einer gepunkteten Linie sind mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen dargestellt. (*wt*, *del9*, *del8* und *p8*)

Die FACS-Analysen ergaben ein unterschiedliches Expressionsmuster des $\alpha\beta 3$ -Integrinrezeptors in den verschiedenen Klonen ($p < 0,001$; Oneway Varianz-Analyse). Während der Rezeptor in 50,4% der untransfizierten MDA-MB-435S Zellen detektiert werden konnte, ließ er sich in über 80% der mit *wt*- bzw. *del9*- oder *del8*-E-Cadherin transfizierten Zellen nachweisen (*wt*: 93,8%; *del 9*: 99,1% und *del 8*: 80,4%). Im Gegensatz dazu erfolgte eine signifikante Reduktion auf 18,4% $\alpha\beta 3$ -Integrin exprimierender Zellen in den mit *p8*-E-Cadherin transfizierten Zellen (Abb. 31, A+B).

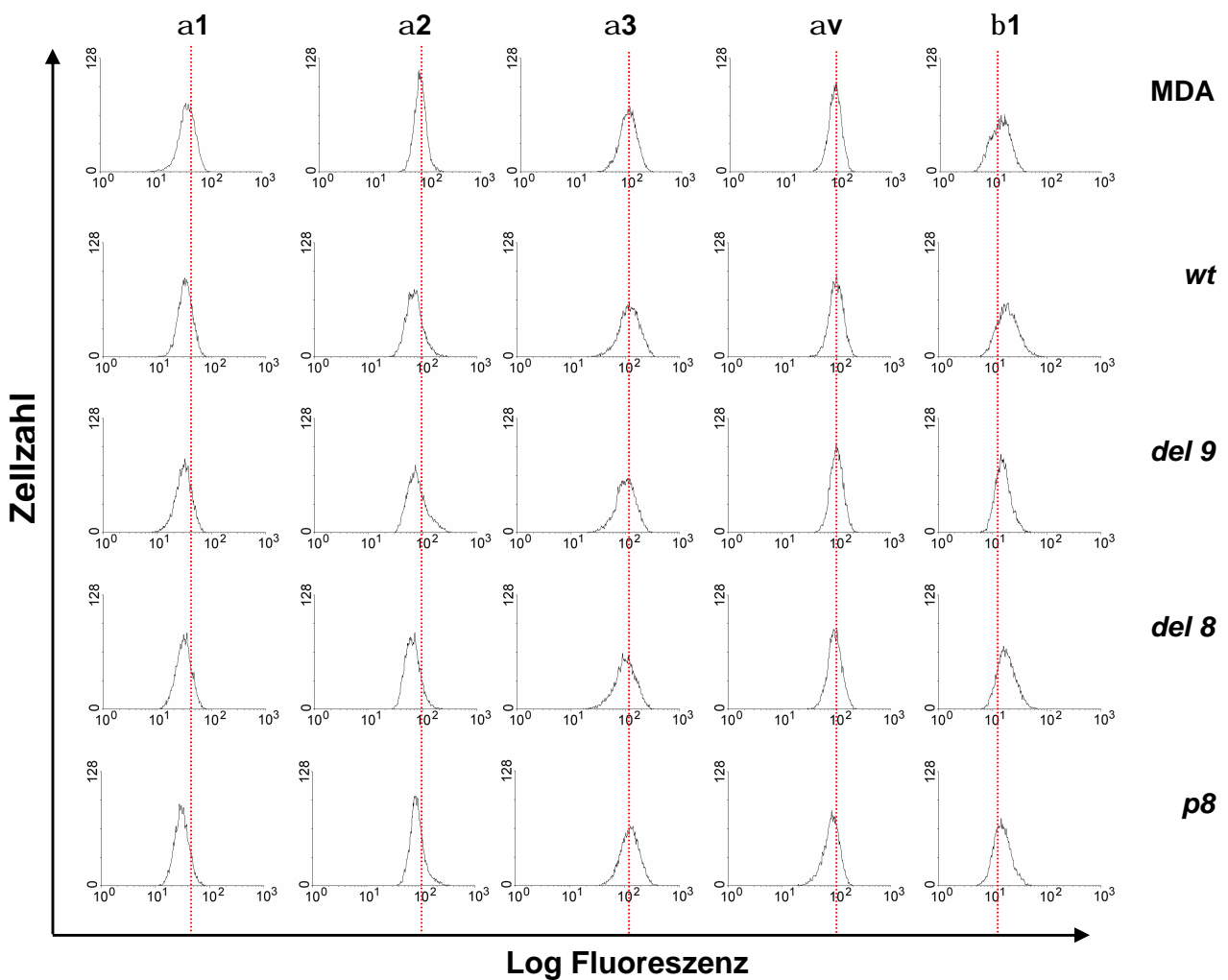


Abb. 32: Nachweis der Expression verschiedener Integrinuntereinheiten in untransfizierten und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen mittels FACS-Analyse

Je 6×10^5 untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden 1 h mit den entsprechenden Primärantikörpern (Konzentration: 4 $\mu\text{g/ml}$) auf Eis inkubiert, gewaschen und 45 min mit dem Sekundärantikörper (DTAF, Konzentration: 20 $\mu\text{g/ml}$) auf Eis abgedunkelt inkubiert. Die jeweiligen Signale in dieser Abbildung weisen auf die Oberflächenexpression der entsprechenden Integrine hin. Ein repräsentatives FACS-Ergebnis wurde für jedes Integrin ausgewählt. Die roten Linien dienen der besseren Vergleichbarkeit der Integrinexpression zwischen den verschiedenen Zelllinien.

Keinen Unterschied im Expressionsmuster wiesen die untersuchten Zelllinien für die Integrine $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, αv und $\beta 1$ auf, d.h. der E-Cadherin-Status hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Expression dieser Integrine in untransfizierten und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen (Abb. 32). Die Expression der Integrine untereinander verglichen war bei $\alpha 2$, $\alpha 3$ und αv stark erhöht. Eine deutlich schwächere Signalintensität zeigte sich für die beiden Untereinheiten $\alpha 1$ und $\beta 1$. Parallel wurden für alle Klone zusätzliche Experimente mit Zellen, die auf Collagen I beschichteten Schalen ausgesät worden waren, durchgeführt. Da die Ergebnisse der Parallelansätze identisch waren, d.h. Collagen I keinen zusätzlichen Einfluss auf das Expressionsmuster der untersuchten Integrine in diesen Zelllinien hatte, wurden diese Resultate nicht dargestellt. FACS-Analysen mit entsprechenden Isotypenkontrollen sowie Inkubation der Zellen nur mit Primär- bzw. Sekundärantikörper wurden als Kontrollexperimente durchgeführt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass mutierte E-Cadherine die Expression Collagen-spezifischer Integrine zum Teil beeinflussen. Während die Expression des Membran-ständigen $\alpha v\beta 3$ -Rezeptors durch *wt*-, *de18*- und *de19*-E-Cadherin im Vergleich zu parentalen MDA-MB-435S Zellen hoch reguliert wird, kommt es zu einer deutlichen Reduktion des Integrindimers in *p8*-E-Cadherin exprimierenden Zellen. Ob E-Cadherin nur einen Einfluss auf die Lokalisation oder auch auf die Expression des $\alpha v\beta 3$ -Rezeptors, muss noch geklärt werden. Kein Unterschied konnte in parentalen und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen für die Integrine $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, αv und $\beta 1$ beobachtet werden, was zu der Hypothese führt, dass diese Integrine nur sekundär eine Rolle in der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität spielen.

3. Rolle der EGF-Rezeptor-Signalkaskade in E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen

Neben Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zählt die Weiterleitung von extrazellulären Signalen in die Zelle zu den wichtigen Faktoren, welche die Motilität einer Zelle beeinflussen können. Deshalb wurde in weiteren Experimenten die Beteiligung der Zellmotilitäts-assoziierten EGF-Rezeptor-Signalkaskade untersucht. Der EGF-Rezeptor aktiviert verschiedene *downstream* Signalmoleküle, zu denen die

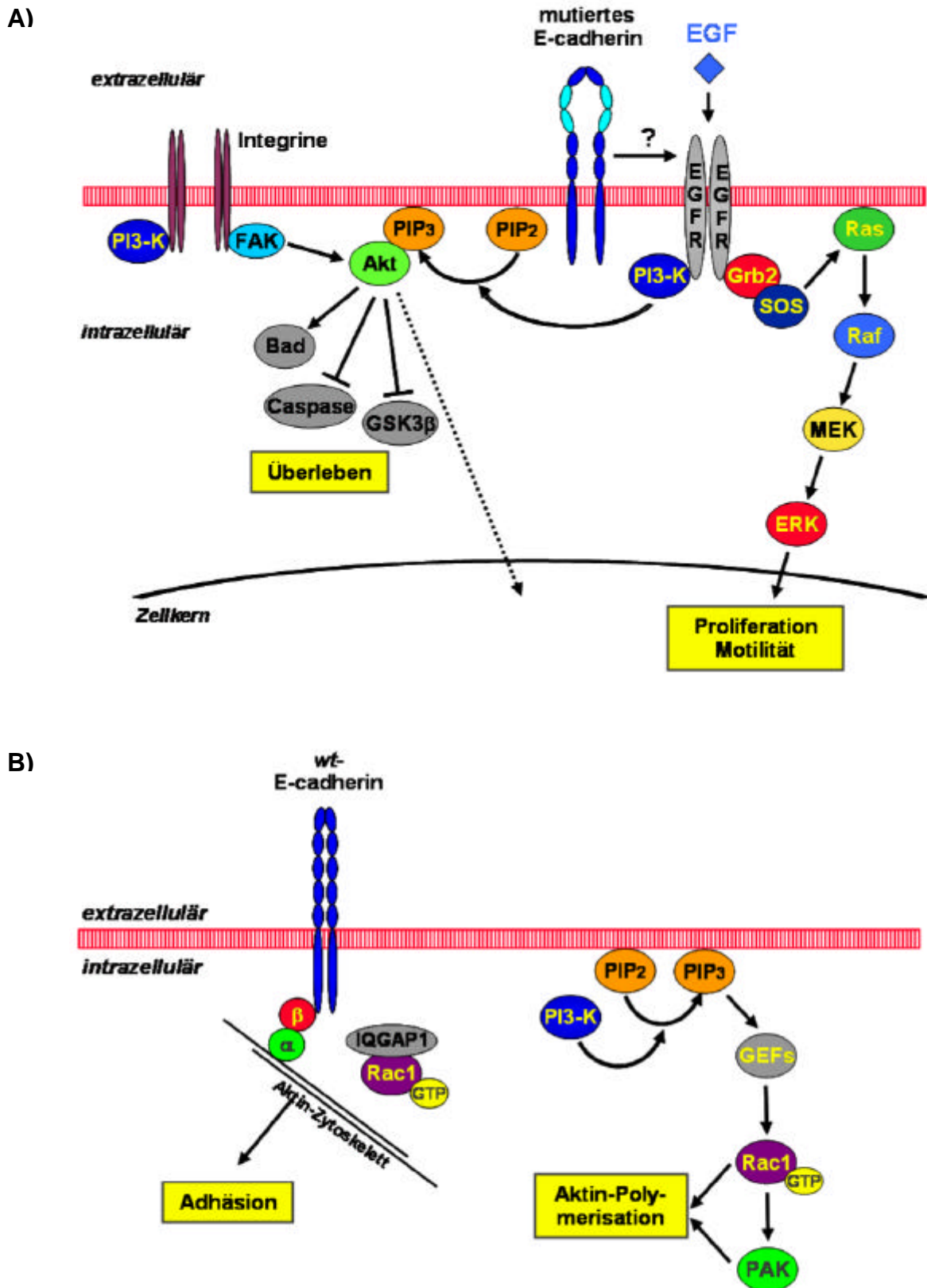


Abb. 33: Schematische Darstellung ausgewählter Signalwege und –moleküle
 A. Dargestellt ist die EGF-Rezeptor/PI3-Kinase-Signalkaskade mit den in vorliegender Arbeit untersuchten Signalmoleküle (EGF-Rezeptor, PI3-Kinase, Akt/PKB und ERK). An welcher Stelle mutiertes E-Cadherin in diese Kaskade eingreift, ist noch nicht geklärt. B: Die aktivierte Form der RhoGTPase Rac1 ist sowohl in die Adhäsion, als auch in die Aktin-Polymerisation involviert. In diesem Zusammenhang ist Rac1 für das Motilitätsverhalten von Zellen von Bedeutung.

Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), die Proteinkinase B (Akt/PKB) und die mitogen aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) gehören (Abb. 33) (Prenzel *et al.*, 2001). Um die Bedeutung dieser Signalmoleküle in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität zu analysieren, wurden verschiedene Inhibitoren in Versuchen mit der Inkubationskammer eingesetzt. Bei den Hemmstoffen handelte es sich um den spezifischen EGF-Rezeptor Inhibitor Tyrphostin AG1478 (Osherov and Levitzki, 1994), den MAP-Kinase Kinase Inhibitor PD98059, welcher die Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung der MAP-Kinase verhindert (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995) sowie den synthetischen PI3-Kinase Inhibitor LY294002, welcher die ATP-Bindungsstelle des Enzyms blockiert (Baumann and West, 1998). Ein Toxizitätstest der Inhibitoren wurde vor Applikation durchgeführt und somit eine optimale, nicht toxische Hemmstoffkonzentration ermittelt. Die inhibitorische Wirkung der Hemmstoffe wurde zusätzlich in Western-Blot-Analysen nachgewiesen (siehe Ergebnisse Teil III).

3.1 Die durch mutiertes E-Cadherin-vermittelte Motilität ist sensitiv gegenüber Inhibitoren des EGF-Rezeptors und der PI3-Kinase

Die in der Inkubationskammer durchgeführten Experimente zeigten, dass der EGF-Rezeptor Inhibitor Tyrphostin AG1478 signifikant die Motilität *del8*-E-Cadherin exprimierender Zellen hemmt ($p=0,003$; *Oneway* Varianz-Analyse). Der Prozentsatz motiler, *del8*-E-Cadherin exprimierender Zellen, sowie der Median und die Spanne der Zellgeschwindigkeiten sanken auf das Niveau *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen nach Applikation von Tyrphostin AG1478 ab (Abb. 34, A+B). Eine stärkere Reduktion der Zellmotilität verursachte der PI3-Kinase Inhibitor LY294002 sowohl in *wt*-E-Cadherin ($p=0,254$; *Oneway* Varianz-Analyse) als auch in *del8*-E-Cadherin exprimierenden Zellen ($p<0,001$; *Oneway* Varianz-Analyse) (Abb. 34, A+B). Im Gegensatz dazu hatte der MAP-Kinase Kinase Inhibitor PD98059 keinen signifikanten Effekt auf die Motilität beider Zelllinien (*wt*: $p=0,142$; *del8*: $p=0,238$; *Oneway* Varianz-Analyse) und den Median der Zellgeschwindigkeiten (Abb. 34, A+B).

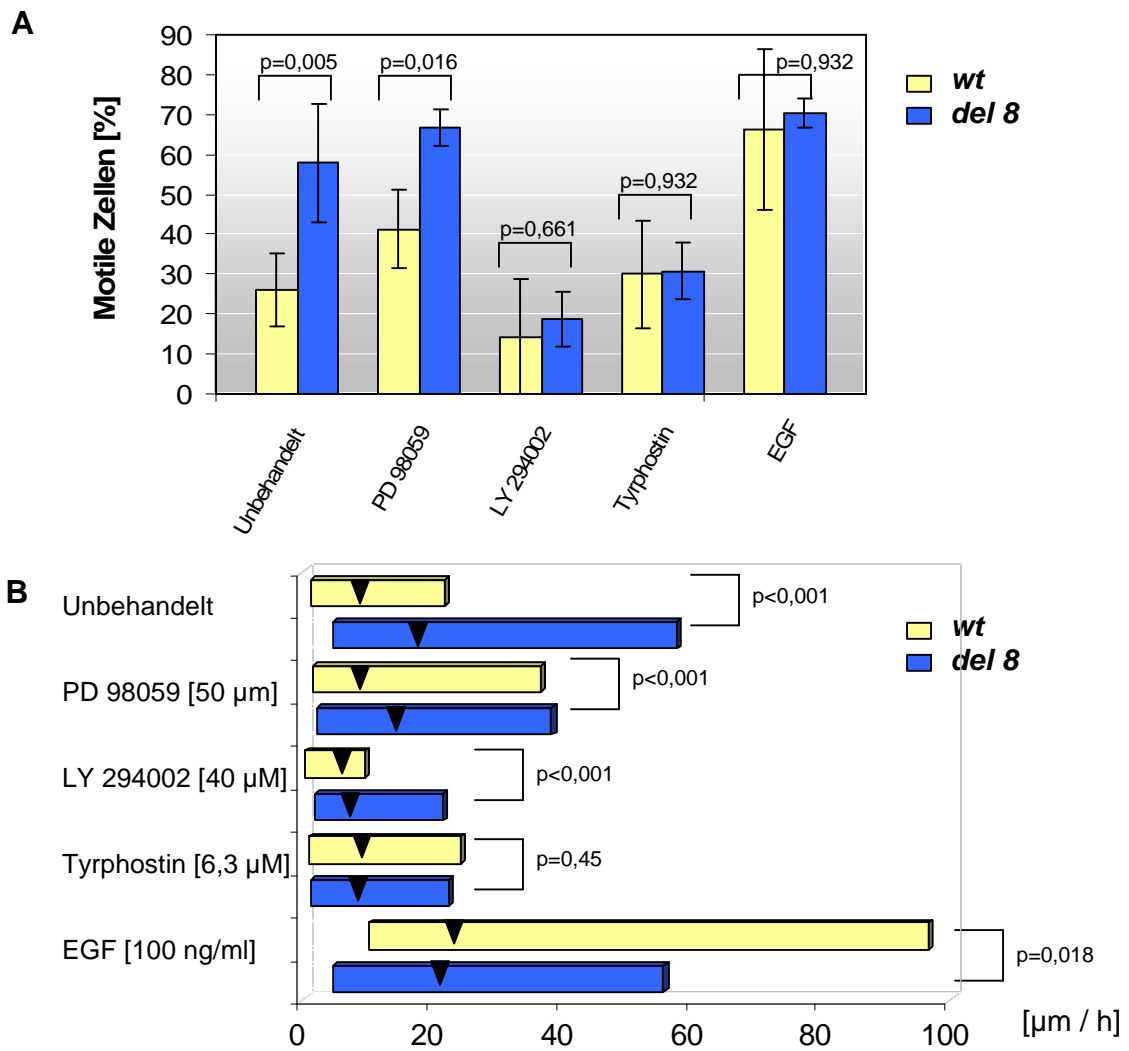


Abb. 34: Einfluss von PD98059, LY294002, Tyrphostin AG1748 und EGF auf die Zellmotilität

Vergleich des Prozentsatzes motiler Zellen (A) und der Spannbreite der Mediane (B) von MDA-MB-435S Zellen, die mit *wt*- oder *del8*-E-Cadherin transfiziert worden waren, in Abhängigkeit von PD98059 (50 µM), LY294002 (40 µM), Tyrphostin AG1478 (6,3 µM) und EGF (100 ng/ml). Die Versuche wurden wie unter Abb. 27 und 28 beschrieben zeitgleich durchgeführt. Die Balken in Abbildung A) repräsentieren den Mittelwert ± der Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Der Einfluss der Inhibitoren bzw. des Aktivators auf beide Zelllinien im Vergleich wurde statistisch in A) mit dem T-Test durchgeführt. Der Einfluss einer Substanz auf den Median und die Zellgeschwindigkeit beide Zelllinien im Vergleich wurde statistisch in B) mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt.

3.2 EGF erhöht die Motilität *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen

In vorliegender Arbeit hat sich gezeigt, dass die Motilität *del8*-E-Cadherin exprimierender MDA-MB-435S Zellen durch den spezifischen EGF-Rezeptor Inhibitor Tyrphostin AG1478 signifikant auf das Niveau *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen reduziert werden konnte, d.h. der EGF-Rezeptor eine Rolle in der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität spielt. Dies warf die Frage auf, ob der

Wachstumsfaktor EGF eine Steigerung der Migration *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen induzieren kann und ob sich die Motilität *de/8*-E-Cadherin exprimierender Zellen nach EGF-Applikation weiterhin erhöhen lässt.

Die Versuche in der Inkubationskammer ergaben einen Anstieg des Prozentsatzes motiler, *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen auf das Niveau *de/8*-E-Cadherin exprimierender Zellen ($p=0,932$; T-Test; Abb. 34, A). Die Spanne der Zellgeschwindigkeiten lag deutlich höher gegenüber der Spanne der Zellen, die mit *de/8*-E-Cadherin transfiziert worden waren (Abb. 34, B). EGF induzierte zudem Filopodien und es wurden keine Zell-Zell-Kontakte mehr ausgebildet (Daten nicht gezeigt). Die Motilität *de/8*-E-cadherin exprimierender Zellen konnte durch den Wachstumsfaktor nicht signifikant erhöht werden ($p=0,106$; *Oneway* Varianz-Analyse). Die Wirksamkeit der Kinase-Inhibitoren, welche in dieser Arbeit verwendet worden waren, wurde in Western-Blot-Analysen getestet (siehe unter Punkt III.).

II. Räumliche und zeitliche Verteilung von mutiertem E-Cadherin während der Zellbewegung

Im Rahmen vorliegender Arbeit sollte durch den Einsatz einer Temperatur- und CO₂-geregelten Inkubationskammer die räumliche und zeitliche Verteilung von *wt*- und mutiertem E-Cadherin nach Applikation der EGF-Rezeptor- und PI3-Kinase-Hemmstoffe Tyrphostin AG1478 und LY294002 und des Wachstumsfaktors EGF *in vitro* untersucht werden. Für diese Experimente wurden zunächst E-Cadherin-EGFP (EcadEGFP) Konstrukte hergestellt, in denen das E-Cadherin-Gen N-terminal vor das EGFP-Gen im pEGFP-N2 Vektor kloniert wurde (siehe Methoden). MDA-MB-435S Karzinomzellen, welche kein endogenes E-Cadherin exprimieren (Cano *et al.*, 2000; Graff *et al.*, 1995), wurden mittels der TransFast™ Methode mit den EcadEGFP-Vektoren transfiziert. Zur Kontrolle wurden MDA-MB-435S Zellen mit dem pEGFP-N2 Vektor alleine transfiziert, um Vektor-vermittelte Effekte in den Experimenten ausschließen zu können. Stabile Klone, die EGFP bzw. das Fusionsprotein exprimieren, wurden etabliert (siehe Methoden). Für die weiteren Versuche wurden eine wenig motile (*wt*-EcadEGFP) und eine sehr motile Zelllinie (*p8*-EcadEGFP) ausgewählt. EGFP ist eine modifizierte Form des *Green Fluorescent Proteins* (GFP), die sich durch eine verstärkte Fluoreszenz im Vergleich zu GFP auszeichnet.

1. *In vitro* Lokalisation von mutiertem E-Cadherin und Zellmigration

1.1 Charakterisierung stabiler EcadEGFP-Klone

1.1.1 Sequenzanalysen des E-Cadherin Gens

Zunächst musste sichergestellt werden, dass die stabilen Klone das E-Cadherin-EGFP Fusionsprotein exprimierten, und dass das E-Cadherin-Gen ohne zusätzliche Mutationen in den Zellen vorlag. Deshalb wurde genomische DNA aus den transfizierten Zellen isoliert und das gesamte E-Cadherin-Gen sequenziert. Wie in Abb. 35 dargestellt, ergaben die Sequenzanalysen, dass alle Klone die mutierte STOP-Codon-Sequenz (TAG→TTAG) tragen, so dass das Fusionsprotein exprimiert werden kann und es zu keinem Translationsabbruch vor dem EGFP kommt. Weiterhin zeigte sich, dass die Klone, die mutiertes E-Cadherin exprimierten, die entsprechende Punktmutation im Exon 8 (GAT→GCT, D370A) aufwiesen (Abb. 35). In den übrigen, hier nicht abgebildeten Sequenzabschnitten, wurden keine zusätzlichen Mutationen gefunden.

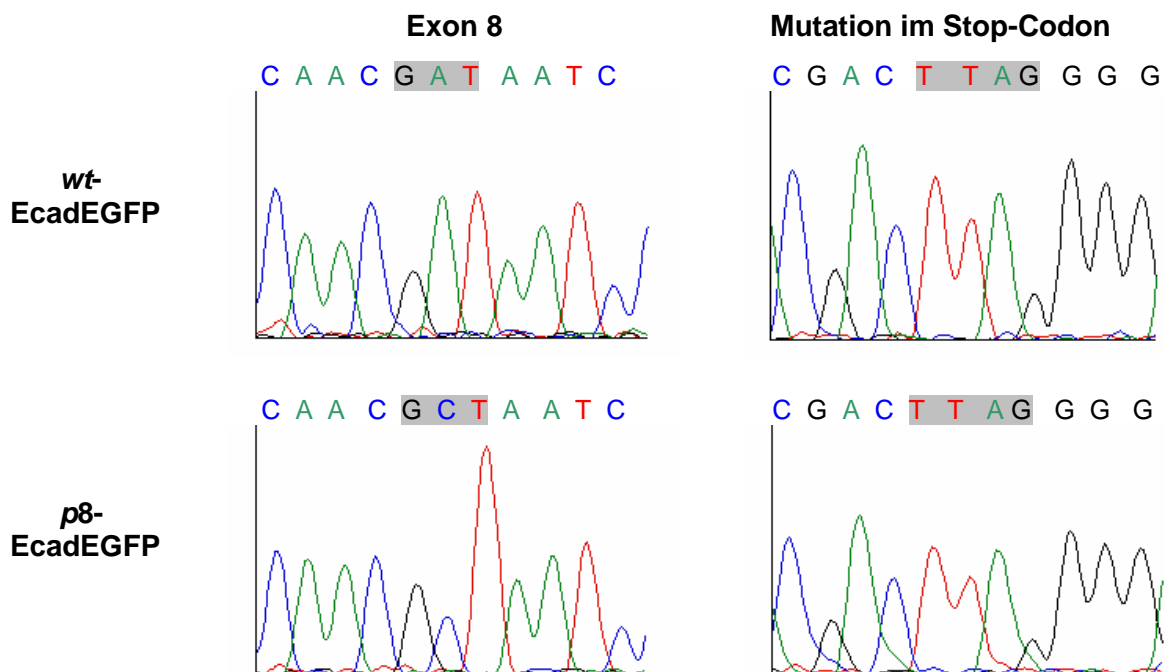


Abb. 35: Sequenzanalyse des E-Cadherin-Gens

MDA-MB-435S Zellen, die mit *wt*- oder *p8*-EcadEGFP transfiziert worden waren, wurden 3 Tage auf unbeschichteten Schalen kultiviert, genomische DNA mit einem kommerziellen Kit isoliert und das gesamte E-Cadherin Gen sequenziert. Grau hinterlegt sind die Bereiche mit der eingefügten Mutation im Stop-Codon (TAG→TTAG; D370A) sowie der Punktmutation bzw. der Originalsequenz im Exon 8 (GAT→GCT).

1.1.2 Nachweis der EcadEGFP - Expression auf Proteinebene

Die Expression von EGFP, *wt*- und *p8*-EcadEGFP wurde durch Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Zelllysate EGFP- bzw. das Fusionsprotein exprimierender Zellen wurden durch den Einsatz von E-Cadherin- und GFP-spezifischen Antikörpern, welche gegen je einen Teil des Fusionsproteins gerichtet sind, untersucht. Mit beiden Antikörpern konnte in den EcadEGFP-exprimierenden Zelllinien eine Bande bei ca. 150 kDa detektiert werden, die der Höhe des Fusionsproteins entspricht, d.h. ca. 30 kDa über der E-Cadherin Bande des Kontrolllysats liegt (Abb. 36, A+B). In den Lysaten der Vektor-transfizierten Zellen konnte nur die EGFP-Bande bei 30 kDa identifiziert werden (Abb. 36, B).

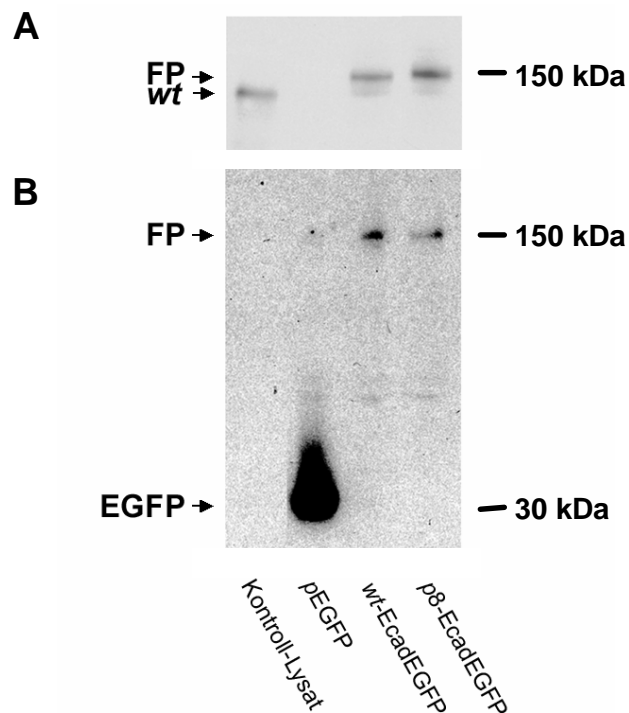


Abb. 36: Nachweis der EGFP- und E-Cadherin-Expression in transfizierten MDA-MB-435S Zellen mittels Western-Blot-Analysen

MDA-MB-435S Zellen, die mit dem pEGFP-N2 Vektor bzw. mit *wt*-EcadEGFP oder *p8*-EcadEGFP transfiziert worden waren, wurden 2 Tage auf unbeschichteten Gewebekulturschalen kultiviert, lysiert, die gleiche Menge an Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS/PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Verdünnungen der Primärantikörper betragen: AEC 1:2000, GFP 1:1000. Die Detektion erfolgte mittels ECL. A: Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen Anti-E-Cadherin-Antikörper. B: Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen Anti-GFP-Antikörper. Während in den mit EcadEGFP transfizierten MDA-MB-435S Zellen das Fusionsprotein mit beiden Primärantikörpern nachgewiesen werden konnte (A+B: Bande bei 150 kDa), ließ sich in den Vektor-transfizierten Zellen EGFP nur mit dem GFP-Antikörper detektieren (B: Bande bei 30 kDa). Als Kontrolle wurde Lysat von A431 Zellen verwendet. FP: Fusionsprotein. *wt*: *wt*-E-Cadherin.

Mittels Western-Blot-Analysen wurde die Expression der Fusionsproteine bzw. des EGFP nachgewiesen. Mit dieser Methodik konnte aber keine Aussage darüber gemacht werden, wie stark die EGFP-Signalintensität individueller Zellen ist und wie viele Zellen innerhalb der Klone EGFP- bzw. EcadEGFP-positiv sind. Dabei handelt es sich um wichtige Kriterien für die Experimente in der Inkubationskammer, denn nur intensiv fluoreszierende Zellen eignen sich gut für Fluoreszenzaufnahmen. Deshalb wurden zusätzlich FACS-Analysen mit den verschiedenen Klonen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte MDA-MB-435S Zellen verwendet, um die Eigenfluoreszenz dieser Zelllinie von der Fluoreszenz des EGFP unterscheiden zu können.

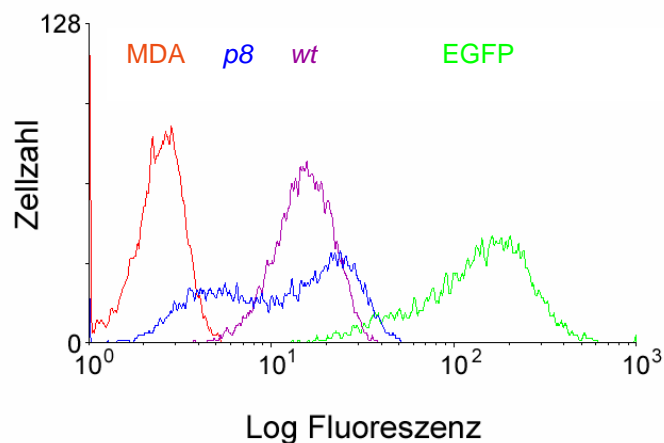


Abb. 37: Nachweis der EGFP-Expression in EcadEGFP-transfizierten MDA-MB-435S Zellen mittels FACS-Analyse

Untransfizierte und EGFP, *wt*-EcadEGFP bzw. *p8*-EcadEGFP exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden 3 Tage auf unbeschichteten Schalen kultiviert, mit Versene abgelöst, in PBS aufgenommen und mittels FACS-Analyse auf ihre Fluoreszenz untersucht. Rot: untransfizierte MDA-MB-435S Zellen (MDA); grün: Vektor-transfizierte MDA-MB-435S Zellen (EGFP); lila: mit *wt*-EcadEGFP transfizierte MDA-MB-435S Zellen (*wt*); blau: mit *p8*-EcadEGFP transfizierte MDA-MB-435S Zellen (*p8*).

Vektor-transfizierte MDA-MB-435S Zellen (pEGFP) wiesen die stärkste Signalintensität auf (Abb. 37), welche sich deutlich von der Eigenfluoreszenz der Kontrollzellen (MDA) unterschied. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine gemischte Zellpopulation mit einem breiten Fluoreszenzspektrum vorlag, d.h. manche Zellen exprimierten sehr viel EGFP und fluoreszierten deshalb stärker als andere Zellen. Klone, die das Fusionsprotein exprimierten (*wt*-EcadEGFP, *p8*-EcadEGFP), waren im Vergleich zur Negativkontrolle durch einen ebenfalls deutlichen Anstieg des Signals gekennzeichnet (Abb. 37). Während bei

wt-EcadEGFP exprimierenden Zellen ein schmaler *Peak* zu beobachten war, wiesen im Gegensatz dazu Zellen, die mit *p8*-EcadEGFP transfiziert worden waren, ein sehr breites Fluoreszenzspektrum auf, das sich teilweise mit dem Signal der Kontrollzellen überschneidet. Eine Tendenz zu einer zweiten, sich durch eine geringere Signalintensität auszeichnenden Population, war zu erkennen. Dies kann dadurch begründet sein, dass die Zellen dieser Population das Fusionsprotein nur noch in geringen Mengen bzw. aufgrund eines Verlustes der transfizierten cDNA nicht mehr exprimierten.

1.1.3 Immunfluoreszenz-Analysen

Ziel der Immunfluoreszenz-Analysen war es, zu überprüfen, ob sich der in unserer Arbeitsgruppe charakterisierte Einfluss von E-Cadherin auf die Organisation des Aktin-Zytoskelettes in transfizierten MDA-MB-435S Zellen (Handsuh *et al.*, 1999, Luber *et al.*, 2000) auch in EcadEGFP Klonen bestätigen lässt. Daher wurde die Aktin-Färbung mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin in EcadEGFP exprimierenden Klonen wiederholt. Das Ergebnis der Experimente korrelierte mit den bereits vorhandenen Daten. Wie in Abb. 38 zu sehen ist, bildeten *wt*-EcadEGFP exprimierende Zellen Kolonien mit durchgehenden Zell-Zell-Kontakten aus. *wt*-EcadEGFP war überwiegend an den Zellkontaktstellen und nur in geringen Mengen im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 38, A). Das Aktin-Zytoskelett war ringförmig angeordnet sowie parallel angeordnete Aktinfasern durchzogen die Zellen (Abb. 38, B). Im Gegensatz dazu zeichneten sich die Kolonien der MDA-MB-435S Zellen, die mit *p8*-EcadEGFP transfiziert worden waren, durch einen lockeren Zellverband mit auf wenige Kontaktpunkte reduzierten Adhäsionsstellen aus, wodurch Lücken im Monolayer entstanden (Abb. 38, D). Zellen am Klonrand bildeten zudem Lamellipodien aus und zeigten die Tendenz, sich vom Klon wegzubewegen. *p8*-EcadEGFP war sowohl verstärkt an den Zellkontaktstellen als auch im Zytoplasma, um den Zellkern und in den Lamellipodien lokalisiert (Abb. 38, D). Zum Teil konnte ein Aktinring um die Zellen beobachtet werden. Die Aktinfasern verliefen nicht mehr parallel wie bei den *wt*-EcadEGFP exprimierenden Klonen durch die Zelle, sondern ungeordnet. Diese Resultate korrelierten mit den in Handsuh *et al.* (1999) beschriebenen Ergebnissen, womit gezeigt werden konnte, dass EGFP die E-Cadherin-Funktion bei der Aktin-Zytoskelett Organisation nicht beeinträchtigt.

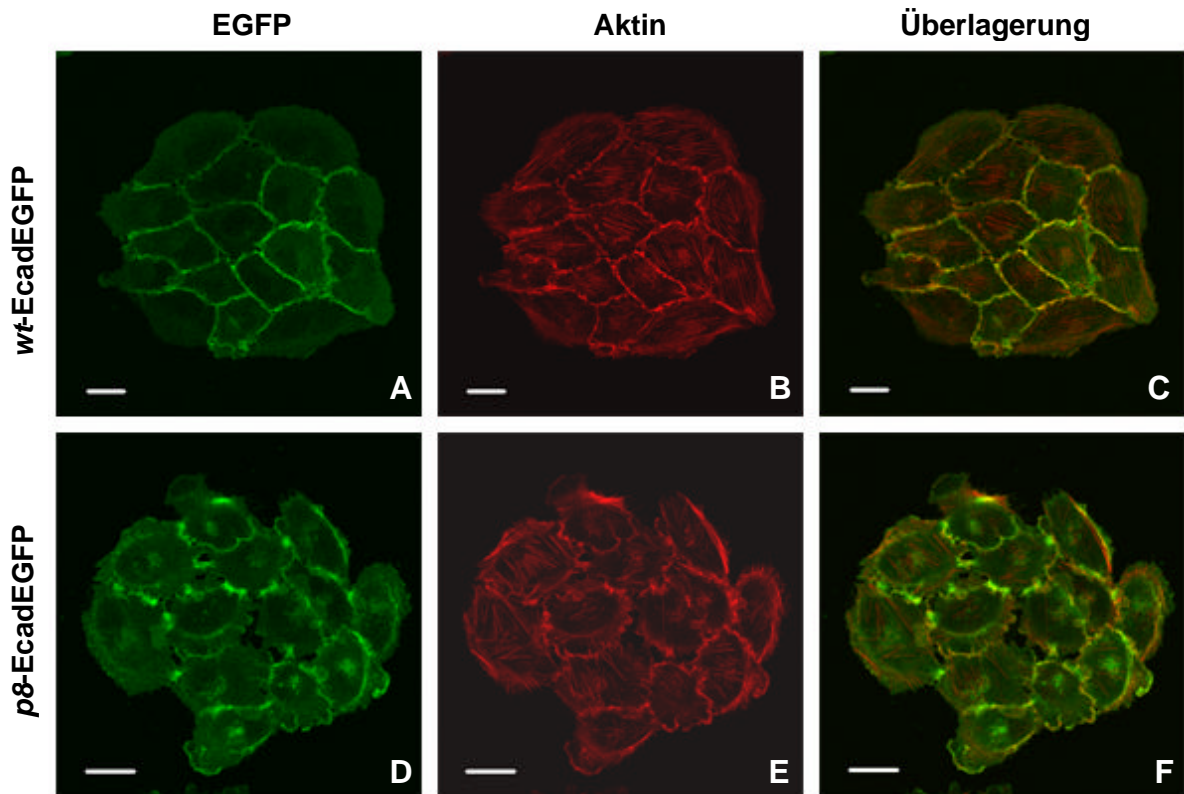


Abb. 38: Nachweis des Aktin-Zytoskelettes durch Rhodamin-gekoppeltes Phalloidin in *wt*- bzw. *p8*-EcadEGFP exprimierenden MDA-MB-435S Zellen

wt-EcadEGFP (A-C) oder *p8*-EcadEGFP (D-E) exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach 3 Tagen mit Formaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin nachgewiesen. Sequenzen von optischen Schnitten in 0,1 μm Intervallen wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop aufgenommen. Eine repräsentative Projektion von 5 Schnitten (0,5 μm) je Klon ist dargestellt. A,D: EcadEGFP-Fluoreszenz. B,E: Aktin-Zytoskelett-Färbung. C,F: Überlagerung von EcadEGFP- und Aktin-Zytoskelett-Färbung. Gelbe Regionen markieren die Kolokalisation von EcadEGFP (grün) mit dem Aktin-Zytoskelett (rot). Die Balken entsprechen einer Länge von 20 μm .

Durch weiteren Immunfluoreszenz-Analysen sollte der Einfluss von mutiertem EcadEGFP auf die intrazelluläre β -Catenin Verteilung untersucht und die von Luber *et al.* (2000) erhaltenen Ergebnisse mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen bestätigt werden. Neben seiner Funktion als Signalmolekül in der *outside-in* Signalübertragung bindet β -Catenin an die zytoplasmatische E-Cadherin-Domäne und verbindet es über α -Catenin mit dem Aktin-Zytoskelett (Aberle *et al.*, 1994; Hülsken *et al.*, 1994; Ozawa *et al.*, 1990; Rimm *et al.*, 1995). Diese Interaktion stellt eine wichtige Voraussetzung für die Zelladhäsivität und die Suppression der Zellmotilität und Invasion dar (Frixen *et al.*, 1991; Vleminckx *et al.*, 1991). Zunächst wurden die EGFP- und β -Catenin-Lokalisation in Vektor-transfizierten MDA-MB-435S

Zellen untersucht, um Vektor-vermittelte Effekte auf die β -Catenin-Lokalisation ausschließen zu können. In diesen Zellen war das EGFP-Signal diffus über das gesamte Zytoplasma verteilt und auffallend verstärkt im Zellkern lokalisiert (Abb. 39, A). Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Protein klein genug ist, um ungehindert durch die Poren der Zellkernmembran in den Zellkern zu gelangen. An den Zellkontaktstellen konnte keine verstärkte Fluoreszenz beobachtet werden. β -Catenin war in den Vektor-transfizierten Zellen vor allem an den Zellkontaktstellen und zum Teil im Zellkern lokalisiert (Abb. 39, B).

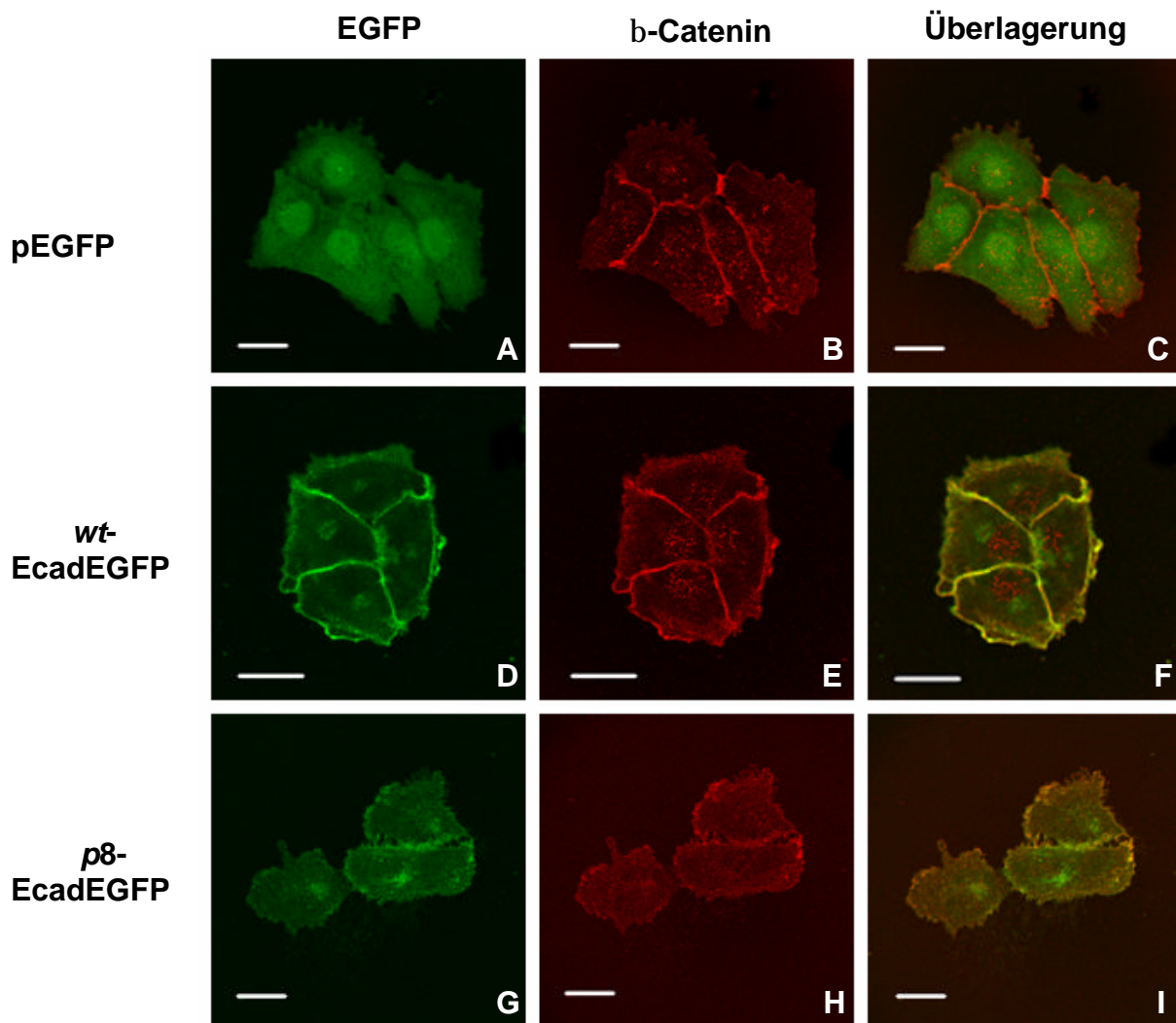


Abb. 39: Nachweis der Lokalisation von β -Catenin mittels Immunfluoreszenz
 MDA-MB-435S Zellen, die mit pEGFP (A-C), wt-EcadEGFP (D-F) oder p8-EcadEGFP (G-I) transfiziert worden waren, wurden auf Deckgläschen ausgesät, nach 3 Tagen mit Formaldehyd fixiert und β -Catenin mit einem polyklonalen Kaninchen-anti- β -Catenin Antikörper und einem TRITC-gekoppelten sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper nachgewiesen. Sequenzen von optischen Schnitten in 0,1 μ m Intervallen wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop aufgenommen. Eine repräsentative Projektion von 9 Schnitten (0,9 μ m) je Klon ist dargestellt. A,D,G: EGFP/EcadEGFP-Fluoreszenz. B,E,H: β -Catenin Färbung. C,F,I: Überlagerung von EcadEGFP bzw. EGFP und β -Catenin. Gelbe Regionen markieren die Kolokalisation von EcadEGFP bzw. EGFP (grün) und β -Catenin (rot). Die Balken entsprechen einer Länge von 20 μ m.

Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle zeigte, dass es sich um keine Kolo-kalisation von EGFP und β -Catenin handelte. Dadurch konnten EGFP-vermittelte Effekte auf die β -Catenin Verteilung in den Vektor-transfizierten Zellen ausgeschlossen werden. Die β -Catenin-Lokalisation an der Zellmembran kann durch N-Cadherin vermittelt sein, welches in MDA-MB-435S Zellen exprimiert wird (Handschuh *et al.*, 2002). Ähnliche Ergebnisse für die β -Catenin Lokalisation wurden in *wt*-EcadEGFP exprimierende Zellen nachgewiesen (Abb. 39, E+F). In diesen Zellen war β -Catenin sowohl an den Zell-Zell-Kontakten, entweder N-Cadherin oder *wt*-EcadEGFP assoziiert, als auch zum Teil im Zellkern lokalisiert. Perinukleär detektiertes *wt*-EcadEGFP befindet sich vermutlich im Golgi-Apparat und es besteht noch keine Interaktion mit β -Catenin. In *p8*-EcadEGFP exprimierenden Zellen waren die Signale sowohl von mutiertem EcadEGFP als auch von β -Catenin diffus über die Zelle verteilt, wobei die Signalintensität am Zellrand und an den Zellkontaktstellen etwas stärker erschien (Abb. 39, G+H). Die perinukleäre *p8*-EcadEGFP Lokalisation war in diesen Zellen ausgeprägter als in *wt*-EcadEGFP exprimierenden Zellen.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Analysen bestätigten die von Luber *et al.* (2000) beschriebene β -Catenin Verteilung in E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen, womit gezeigt werden konnte, dass die EGFP-Markierung an der zytoplasmatischen E-Cadherin-Domäne keinen negativen Einfluss auf die β -Catenin-Bindung an E-Cadherin hat.

1.2 *In vitro* Versuche in der Inkubationskammer

Zur Ermittlung der zeitlichen Lokalisation von mutiertem E-Cadherin während der Zellbewegung und der Motilität der mit EcadEGFP transfizierten MDA-MB-435S Mammakarzinomzellen wurde ein Zeiss Axiovert 100 Mikroskop mit angeschlossenem Zeiss CTI *Controller* und einem beheizbaren Mikroskoptisch mit Lufttemperierung verwendet. MDA-MB-435S Zellen, die mit dem pEGFP-N2 Vektor oder den verschiedenen EcadEGFP Konstrukten (*wt*-EcadEGFP und *p8*-EcadEGFP) transfiziert worden waren, wurden auf mit Collagen I beschichteten Zellkulturpetrischalen mit Glasboden ausgesät und bei 37°C/5% (v/v) CO₂ über Nacht in Voll- oder Hungermedium kultiviert. Die Filme wurden am nächsten Tag 30 min bis 2 h nach Zugabe von Vollmedium alleine oder Vollmedium versetzt mit

EGF (100 ng/ml) bzw. Tyrphostin (6,3 μ M) gestartet. Die Aufnahmen und die Auswertungen wurden wie unter 2.22.2 (Methoden) beschrieben durchgeführt. Die als Sequenzgalerien abgebildeten Filme liegen auf beigefügter CD als Filme im QuickTime Movie Format bei und stellen noch deutlicher das nachfolgend beschriebene Motilitätsverhalten der untersuchten Zellen dar. Die Filme wurden über den gleichen Zeitraum aufgenommen, die Bilder der Sequenzgalerien wurden daraus verwendet.

1.2.1 Lokalisation von *wt*- und mutiertem E-Cadherin und Motilitätsverhalten der Zellen in Vollmedium

Mit *wt*-ECadEGFP transfizierte Zellen zeichneten sich durch geringe Motilität aus (4,8-9,9 μ m/h). Sie legten Wegstrecken von 19-39,4 μ m zurück (Abb. 44, A) und drehten sich meist nur um die eigene Achse oder wiesen Bewegungen an den Zellrändern auf (Abb. 42). Bei geringer Zelldichte bildeten die Zellen kleine Kolonien aus und bestehende Zell-Zell-Kontakte wurden aufrechterhalten, sofern die Zellen sich nicht während des Beobachtungszeitraumes teilten. Nach erfolgter Teilung setzten sie sich wieder ab und bildeten sofort neue Kontakte zu Nachbarzellen aus. *wt*-EcadEGFP war an den Zell-Zell-Kontaktstellen, nicht aber am freien Zellrand detektierbar. Bei stärkerer Vergrößerung konnte man Strukturen erkennen, die wie gebündelte E-Cadherin Moleküle aussahen (Abb. 40, A). An den Außenbereichen zweier miteinander verbundener Zellen war der Kontakt noch stärker ausgeprägt und es konnten E-Cadherin-Ansammlungen detektiert werden (Abb. 40, B).

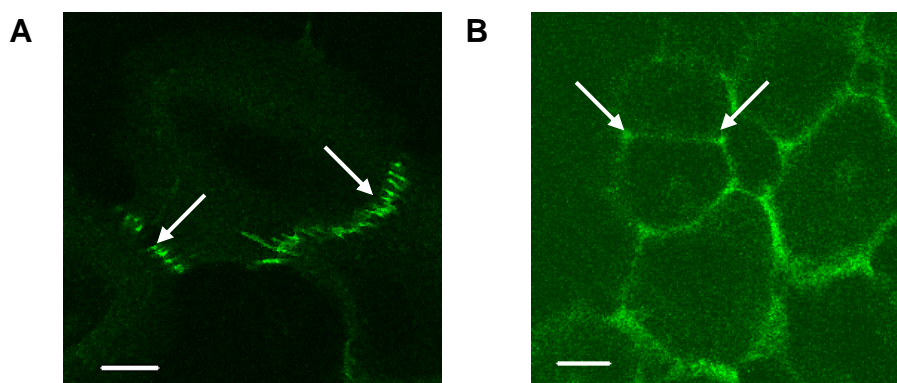


Abb. 40: Lokalisation von *wt*-EcadEGFP in MDA-MB-435S Zellen in Vollmedium

A: Vergrößerung von E-Cadherin Strukturen zwischen zwei benachbarten Zellen, die wie reissverschlussartig gebündelte E-Cadherin Moleküle aussehen. Die Strukturen sind durch Pfeile gekennzeichnet. B: Verstärkte E-Cadherin-Ansammlung an den Randbereichen der Zell-Zell-Kontakte, durch Pfeile markiert. Die Balken in A) und B) entsprechen 10 μ m.

p8-EcadEGFP exprimierende MDA-MB-435S Zellen wiesen im Gegensatz zu den mit *wt*-EcadEGFP transfizierten Zellen eine deutlich erhöhte Motilität innerhalb des Beobachtungszeitraumes auf (5,3-25,7 $\mu\text{m}/\text{h}$; $p=0,023$; Mann-Whitney-Test). Allerdings waren nicht alle Zellen gleich motil (21,4-102,8 μm ; Abb.44, B). Die migrierenden Zellen zeigten eine starke Tendenz, sich voneinander fort zu bewegen und bildeten nur sehr kurzzeitige Zell-Zell-Kontakte aus (Abb. 41). Während der Zellwanderung waren Lamellipodien und eine starke Membrankräuselung erkennbar. Die Bewegung der Zellen war ungerichtet und änderte sich ständig abrupt. Nach erfolgter Zellteilung bewegten sich die Zellen eher von den sie umgebenden Nachbarzellen weg, als dass sie Kontakte zu diesen ausbildeten (Abb. 43). EGFP-markiertes *p8*-E-Cadherin war während der Migration am gesamten Zellrand, vor allem aber in den Lamellipodien, sowie in den lang- und kurzzeitig ausgebildeten Zellkontaktstellen erkennbar. Ebenso war es im Zytoplasma und verstärkt perinukleär lokalisiert (Abb. 41+43).

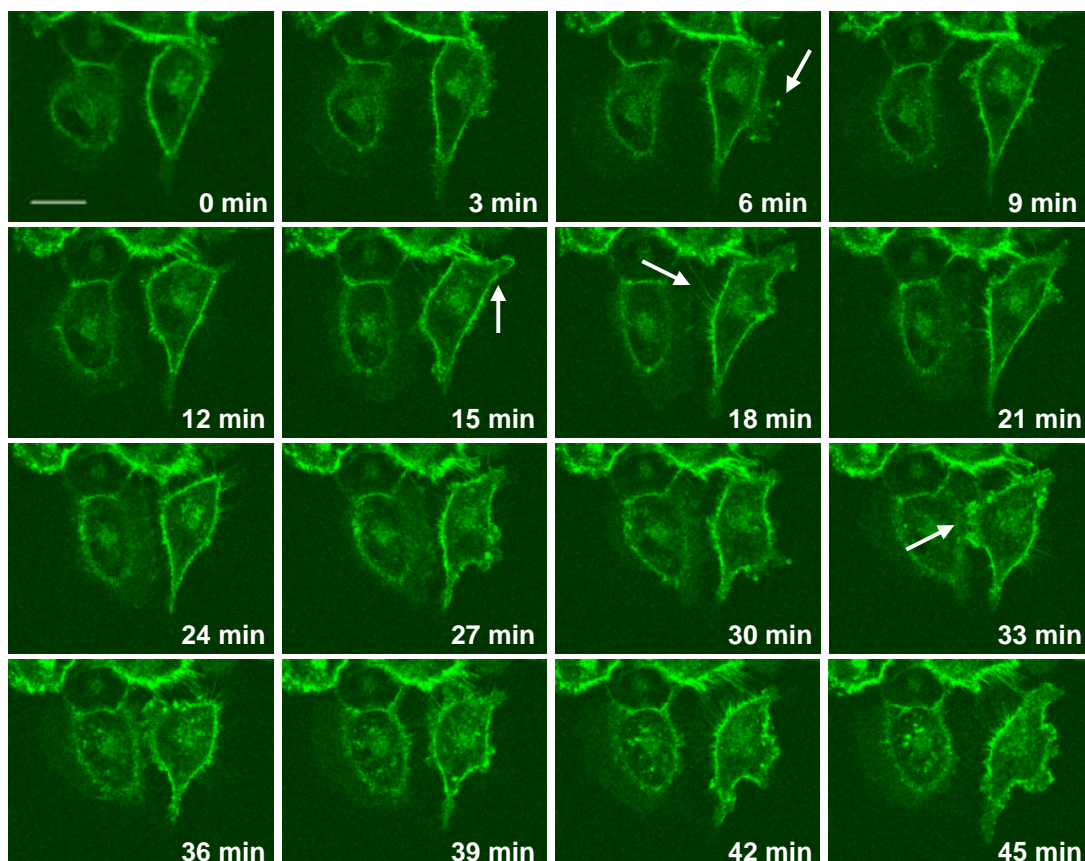


Abb. 41: *p8*-EcadEGFP exprimierende MDA-MB-435S Zellen in Vollmedium

1×10^5 *p8*-EcadEGFP exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden am Vortag auf mit Collagen I beschichteten Gewebekulturschalen mit Glasboden in Vollmedium ausgesät. Die Zellmigration und *p8*-EcadEGFP Lokalisation wurden über einen Zeitraum von 8 h aufgenommen. Dargestellt ist eine Sequenz aus 16 Bildern im Abstand von je 3 min über einen Zeitraum von 45 min. Mit Pfeilen markiert sind Lamellipodien, in denen verstärkt *p8*-EcadEGFP lokalisiert ist, sowie ausgebildete Filopodien und kurzzeitige Zell-Zell-Kontakte. Der Balken entspricht 20 μm .

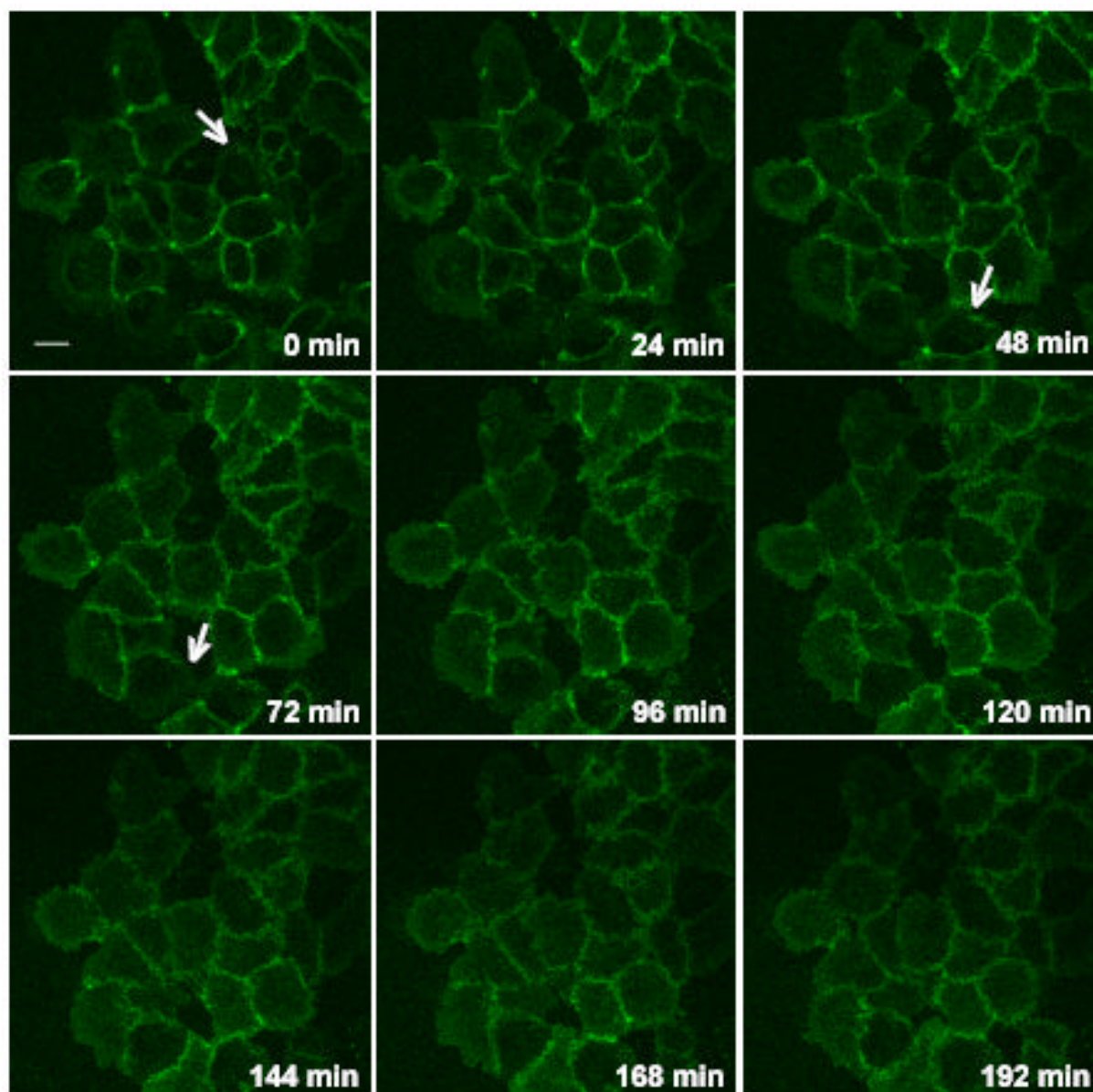


Abb. 42: *wt*-E-CadEGFP exprimierende MDA-MB-435S Zellen: E-Cadherin-Lokalisation in Vollmedium

1×10^5 *wt*-EcadEGFP exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden am Vortag auf mit Collagen I beschichteten Gewebekulturschalen mit Glasboden in Vollmedium ausgesät. Das Medium wurde vor Filmstart erneuert. Die *wt*-EcadEGFP-Lokalisation und die Migration der Zellen wurden wie unter 2.22.2 (Methoden) aufgenommen und ausgewertet. Dargestellt sind 9 Bilder im Abstand von je 24 min über einen Zeitraum von 192 min. Mit Pfeilen markiert sind die Zell-Zell-Adhäsionen und E-Cadherin-Plaques. Der Balken entspricht 20 μm .

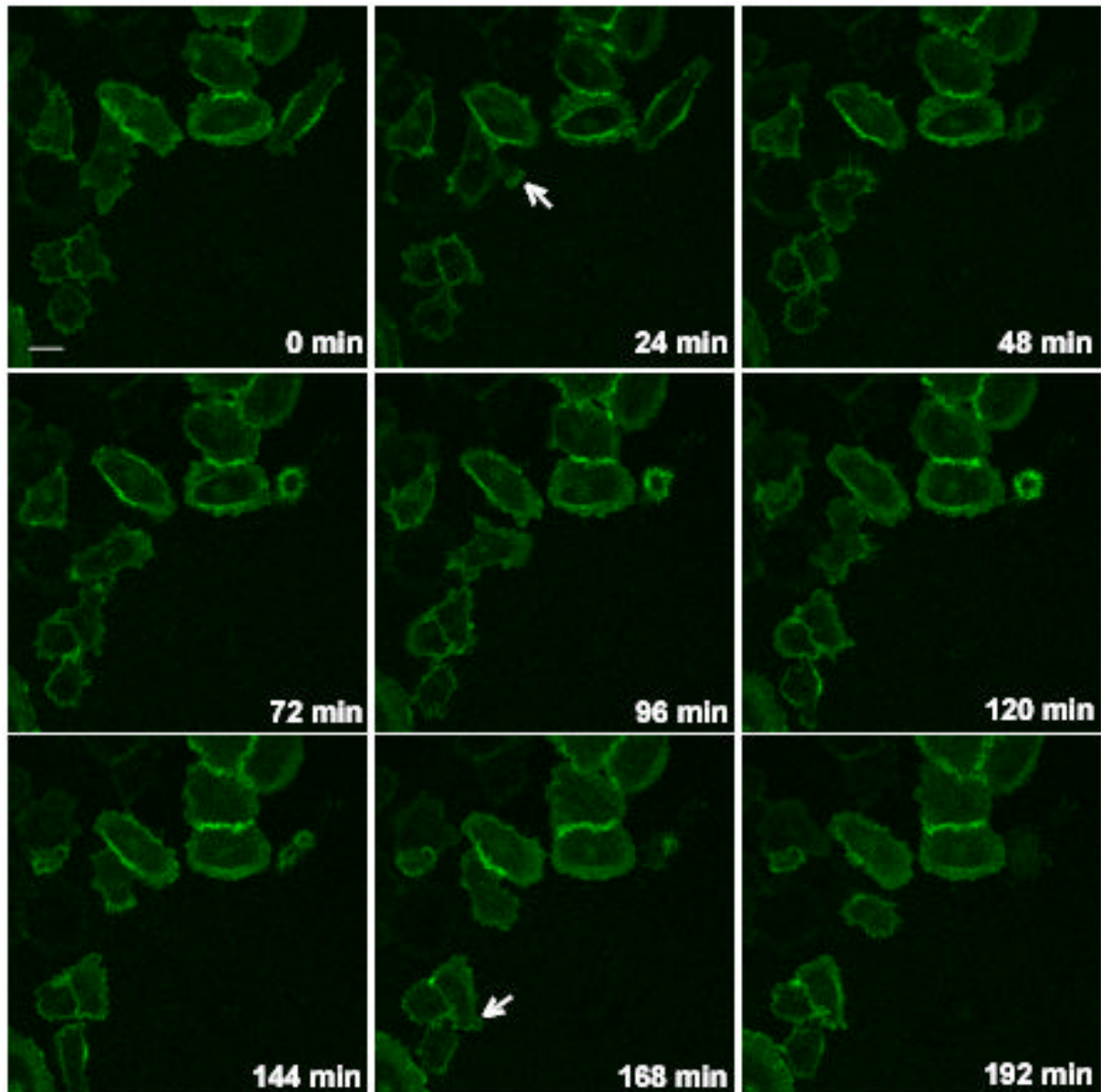


Abb. 43: *p8-E-CadEGFP* exprimierende MDA-MB-435S Zellen: E-Cadherin-Lokalisation in Vollmedium

1×10^5 *p8-EcadEGFP* exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden am Vortag auf mit Collagen I beschichteten Gewebekulturschalen mit Glasboden in Vollmedium ausgesät. Das Medium wurde vor Filmstart erneuert. Die *p8-EcadEGFP*-Lokalisation und die Migration der Zellen wurden wie unter 2.22.2 (Methoden) aufgenommen und ausgewertet. Dargestellt sind 9 Bilder im Abstand von je 24 min über einen Zeitraum von 192 min. Mit Pfeilen markiert sind *p8-EcadEGFP* Ansammlungen in den Lamellipodien. Der Balken entspricht 20 μm .

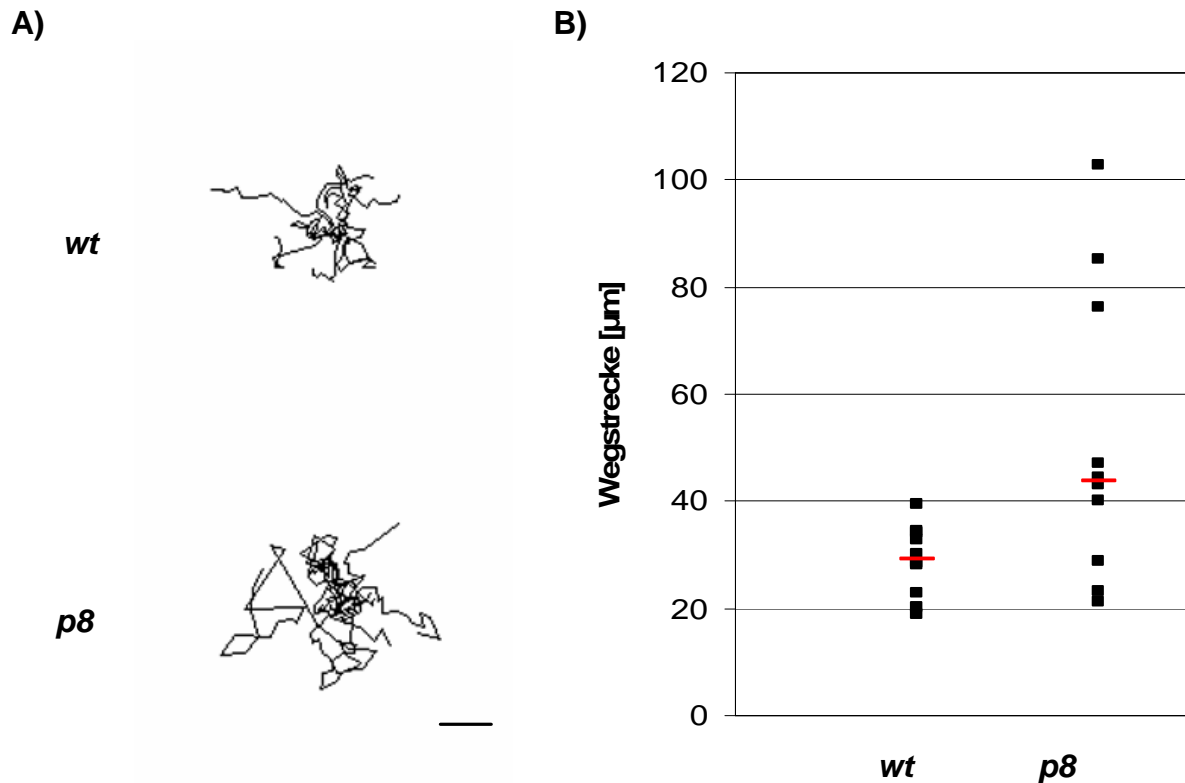


Abb. 44: Wanderungsdistanzen *wt*- und *p8*-EcadEGFP exprimierender MDA-MB-435S Zellen in Vollmedium

Die Wanderung von je 10 zufällig ausgewählten Zellen wurde in einem Zeitraum von 4 h mikroskopisch analysiert und photographisch festgehalten. A: Die Wegstrecken wurden in einer Overlay-Ebene interaktiv nachgezeichnet und die Anfangspunkte in einem gemeinsamen Startpunkt zusammengefasst. Der Balken entspricht 10 µm. B: Die zurückgelegten Wegstrecken [µm] der einzelnen Zellen sind in einem Punktdiagramm dargestellt. Rot markiert ist der Median.

1.2.2 Der EGF-Rezeptor Inhibitor Tyrphostin AG1478 führt zur Lokalisation von mutiertem E-Cadherin an den Zell-Zell-Kontaktstellen

Wie bereits gezeigt, spielt der EGF-Rezeptor-Signalweg in unserem Zellkultursystem eine wichtige Rolle. Um die Bedeutung des Rezeptors für die Lokalisation von *wt*- und *p8*-EcadEGFP sowie die Motilität *wt*- und *p8*-EcadEGFP exprimierenden MDA-MB-435S Zellen *in vitro* zu untersuchen, wurde der EGF-Rezeptor-Inhibitor Tyrphostin AG1478 in Experimenten in der Inkubationskammer eingesetzt. Tyrphostin AG1478 hatte einen signifikanten Einfluss auf die zuvor beschriebene geringe Motilität (1,3-8,8 µm/h) und die Wanderungsdistanzen (15,1-35,2 µm) der mit *wt*-EcadEGFP transfizierten MDA-MB-435S Zellen (Abb. 45, A+B; $p=0,016$; Kruskal Wallis Test). Morphologisch zeichneten sich die Zellen durch eine etwas kleinere und rundlichere Zellform aus, und der Kontakt zwischen den

Zellen war verstärkt. Insgesamt konnte aber keine wesentliche Veränderung gegenüber dem unbehandelten Zustand der Zellen beobachtet werden, was auch auf die Lokalisation des *wt*-EcadEGFP zutrif (Abb. 46). Im Gegensatz dazu wurde der migratorische Phänotyp *p8*-EcadEGFP exprimierender Zellen durch Tyrphostin AG1478 deutlich beeinflusst. Zwar konnte die Motilität der Zellen nicht vollständig auf den Zustand der mit *wt*-EcadEGFP transfizierten Zellen reduziert werden (5,7-20 $\mu\text{m}/\text{h}$; $p=0,199$; Kruskal Wallis Test), aber die Zellen sahen ihnen morphologisch ähnlich, d.h. die Zellen wurden breiter und vorhandene Zell-Zell-Kontakte waren stärker ausgebildet. Die Bewegungsrichtungen änderten sich nicht mehr so abrupt, und eine Reduktion der zurückgelegten Wegstrecken (22,8-80,3 μm , Abb. 45, A+B) und der starken Membrankräuselung war zu erkennen (Abb. 47).

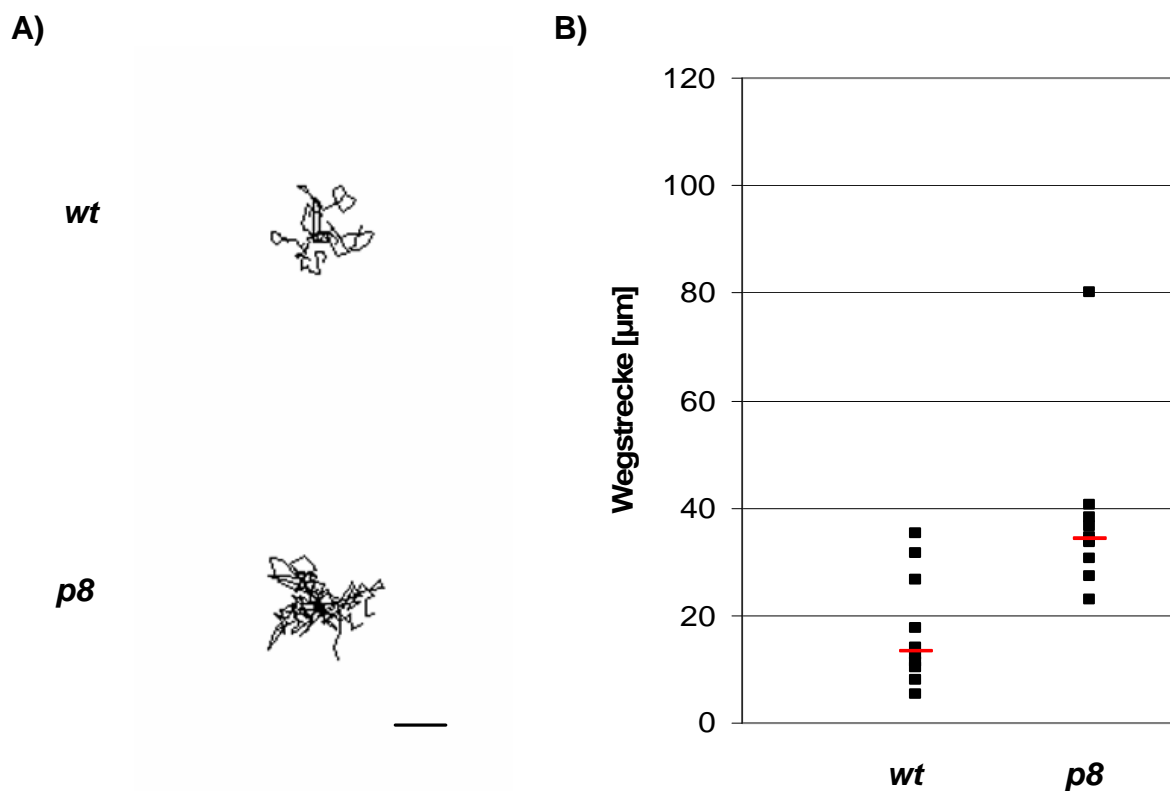


Abb. 45: Wanderungsdistanzen *wt* - und *p8*-EcadEGFP exprimierender MDA-MB-435S Zellen nach Tyrphostin-Zugabe

2 h vor Filmstart wurde 6,3 μM Tyrphostin den Zellen in Vollmedium zugefügt. Die Wanderung von je 10 zufällig ausgewählten Zellen wurde in einem Zeitraum von 4 h mikroskopisch analysiert und photographisch festgehalten. A: Die Wegstrecken [μm] wurden in einer Overlay-Ebene interaktiv nachgezeichnet und die Anfangspunkte in einem gemeinsamen Startpunkt zusammengefasst. Der Balken entspricht 10 μm . B: Die zurückgelegten Wegstrecken der einzelnen Zellen sind in einem Punktdiagramm dargestellt. Rot markiert ist der Median.

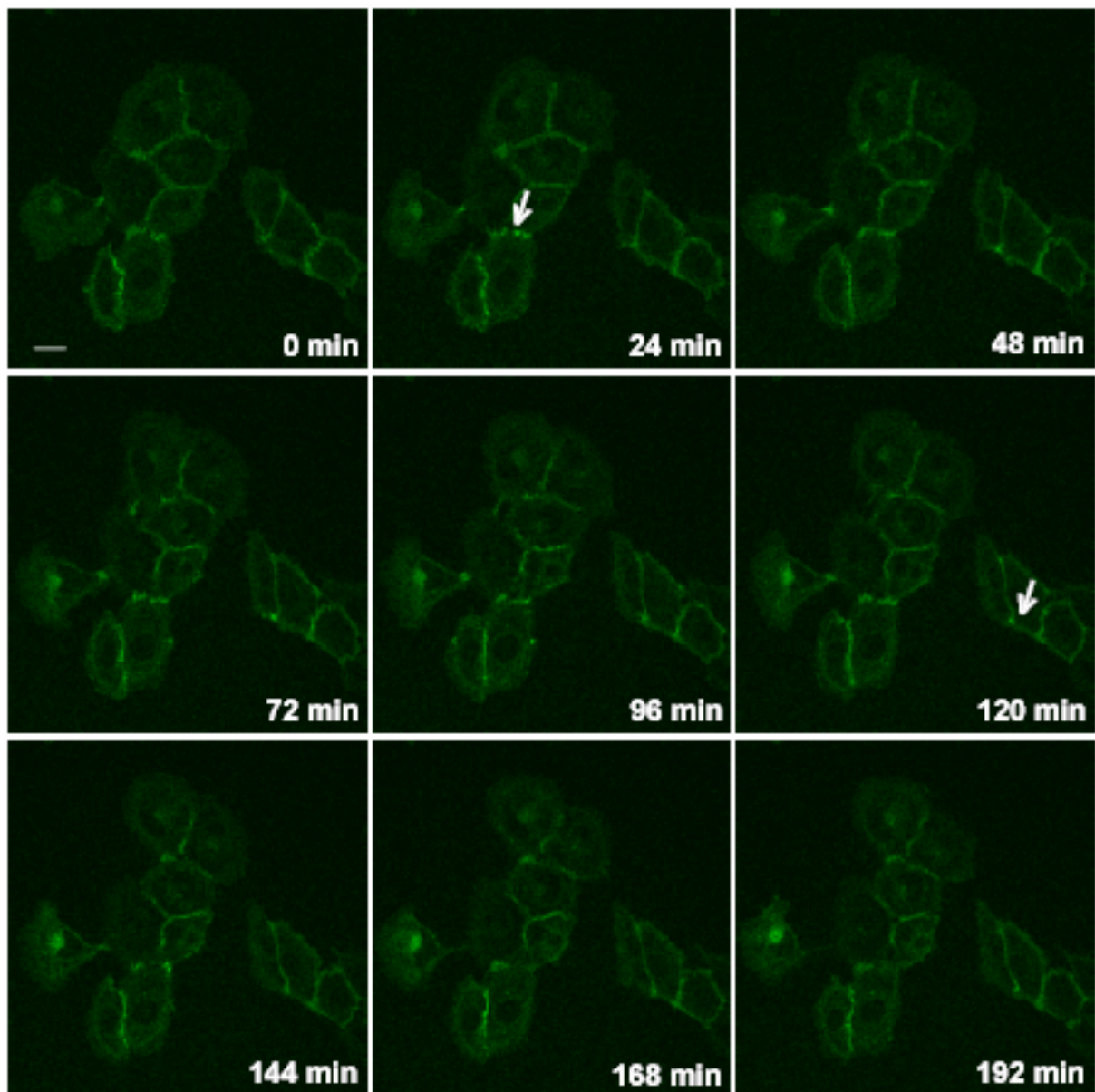


Abb. 46: Einfluss von Tyrphostin AG1478 auf die E-Cadherin-Lokalisation in *wt*-EcadEGFP exprimierenden MDA-MB-435S Zellen

1×10^5 *wt*-EcadEGFP exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden am Vortag auf mit Collagen I beschichteten Gewebekulturschalen mit Glasboden in Vollmedium ausgesät. 6,3 μ M Tyrphostin AG1478 wurde vor Filmstart in frischem Vollmedium zugegeben. Die *wt*-EcadEGFP-Lokalisation und die Migration der Zellen wurden wie unter 2.22.2 (Methoden) aufgenommen und ausgewertet. Dargestellt sind 9 Bilder im Abstand von je 24 min über einen Zeitraum von 192 min. Mit Pfeilen markiert sind E-Cadherin-Ansammlungen an den Zell-Zell-Kontakten und E-Cadherin-Plaques. Der Balken entspricht 20 μ m.

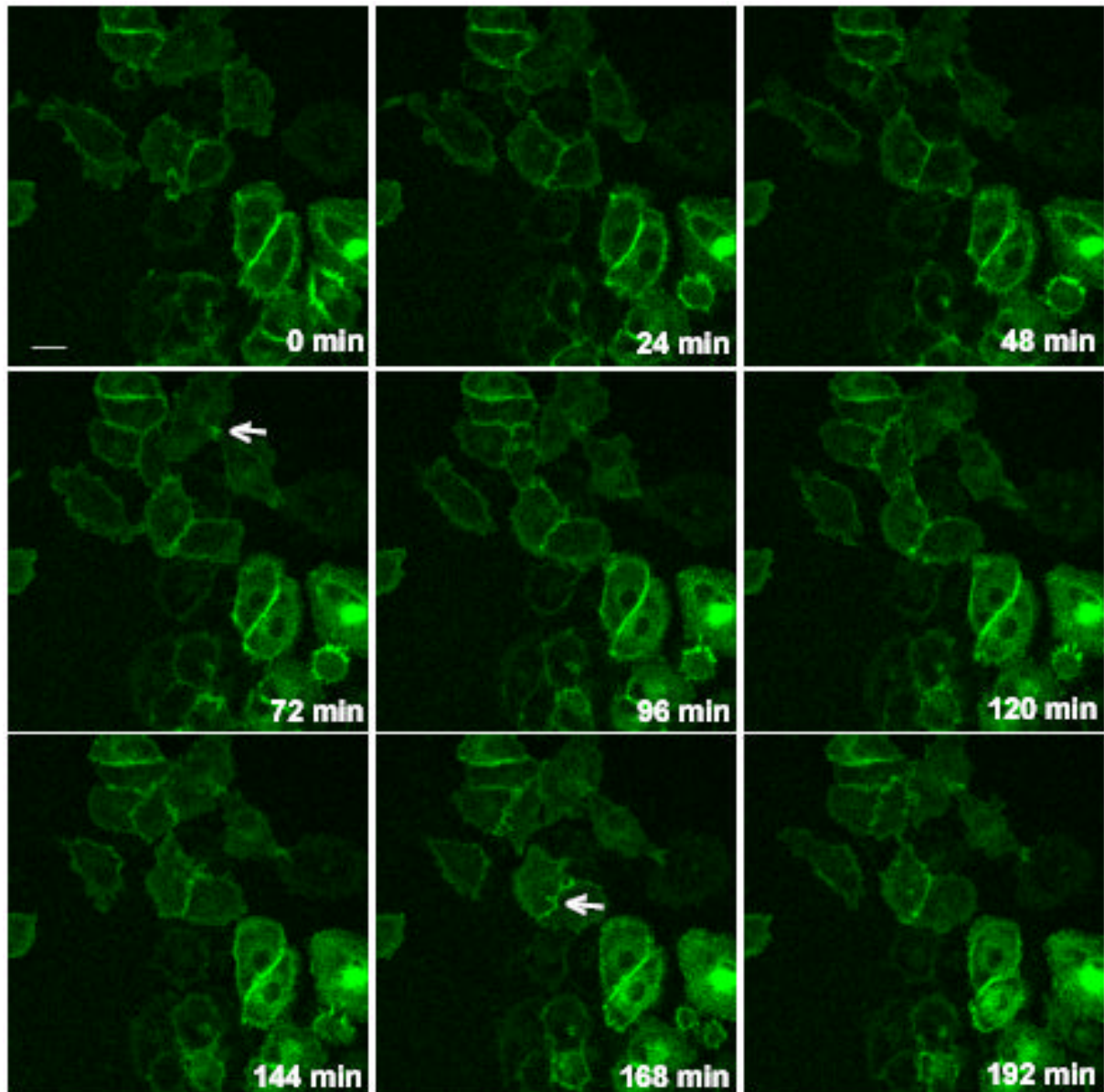


Abb. 47: Einfluss von Tyrphostin AG1478 auf die E-Cadherin-Lokalisation in *p8-EcadEGFP* exprimierenden MDA-MB-435S Zellen

1×10^5 *wt-EcadEGFP* exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden am Vortag auf mit Collagen I beschichteten Gewebekulturschalen mit Glasboden in Vollmedium ausgesät. 6,3 μM Tyrphostin AG1478 wurde vor Filmstart in frischem Vollmedium zugegeben. Die *p8-EcadEGFP*-Lokalisation und die Migration der Zellen wurden wie unter 2.22.2 (Methoden) aufgenommen und ausgewertet. Dargestellt sind 9 Bilder im Abstand von je 24 min über einen Zeitraum von 192 min. Mit Pfeilen markiert sind verstärkte Zell-Zell-Adhäsionen. Der Balken entspricht 20 μm .

Nach einer Zellteilung benötigten die Zellen mehr Zeit, um sich wieder auszubreiten und sie bewegten sich anschließend zu den Nachbarzellen hin und nicht wie im Vollmedium von ihnen weg. *p8-EcadEGFP* war nicht nur in den Lamellipodien lokalisiert und diffus im Zytoplasma verteilt, sondern konnte auch an einigen Stellen verstärkt perinukleär und an den Zell-Zell-Adhäsionen detektiert werden (Abb. 47).

1.2.3 EGF führt zur Lokalisation von *wt-EcadEGFP* in Lamellipodien

Die mit Tyrphostin AG1478 erhaltenen Resultate warfen die Frage auf, ob nach Applikation des Wachstumsfaktors EGF die Lokalisation von *wt-EcadEGFP* verändert und die Suppressorfunktion des *wt-EcadEGFP* in MDA-MB-435S Zellen aufgehoben, d.h. die Motilität der Zellen erhöht werden kann. Um den EGF-vermittelten Effekt zu verstärken, wurden die ausgesäten Zellen über Nacht gehungert (0,5% (v/v) FCS in DMEM). Zellen, die mit *wt-EcadEGFP* transfiziert worden waren, sahen nach dem Hungern sehr spindelig aus und bildeten weder Zell-Zell-Kontakte noch Kolonien aus. Nach Zugabe von EGF verhielten sich die Zellen wie *p8-EcadEGFP* exprimierende MDA-MB-435S Zellen in Vollmedium, d.h. die Zellen waren teilweise lang gestreckt, bildeten Lamellipodien aus und waren durch verstärkte Membrankräuselungen charakterisiert. *wt-EcadEGFP* war sowohl an den Zell-Zell-Kontaktstellen, als auch am Zellrand und verstärkt in den Lamellipodien lokalisiert (Abb. 48). Die Bewegungsrichtungen und somit auch die Morphologie *wt-EcadEGFP* exprimierender Zellen änderte sich abrupt, weitere Wegstrecken wurden zurückgelegt (15,1-62,4 μm ; 3,8-15,6 $\mu\text{m}/\text{h}$; Abb. 50, A+B) und Kontaktbildungen waren nur noch von kurzer Dauer. Einige Zellen wiesen zwar noch eine rundliche Morphologie auf, waren aber durch eine sehr ausgeprägte Zellrandaktivität gekennzeichnet.

Der Einfluss des Wachstumsfaktors auf die mit *p8-EcadEGFP* transfizierten MDA-MB-435S Zellen war nur gering (Abb. 49), d.h. die Zellen verhielten sich wie im unbehandelten Zustand in Vollmedium ($p=0,364$; Kruskal Wallis Test). *p8-EcadEGFP* war am gesamten Zellrand und vor allem in den Lamellipodien und den lang- und kurzzeitig ausgebildeten Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Die Migrationsfähigkeit der Zellen sowie zurückgelegte Distanzen erhöhten sich insgesamt nicht (19,7-97,2 μm ; 5,0–24,3 $\mu\text{m}/\text{h}$; Abb. 50, A+B). Weniger motile Zellen zeichneten sich durch verstärkte Randaktivität und kleine Ausstülpungen am Zellrand aus.

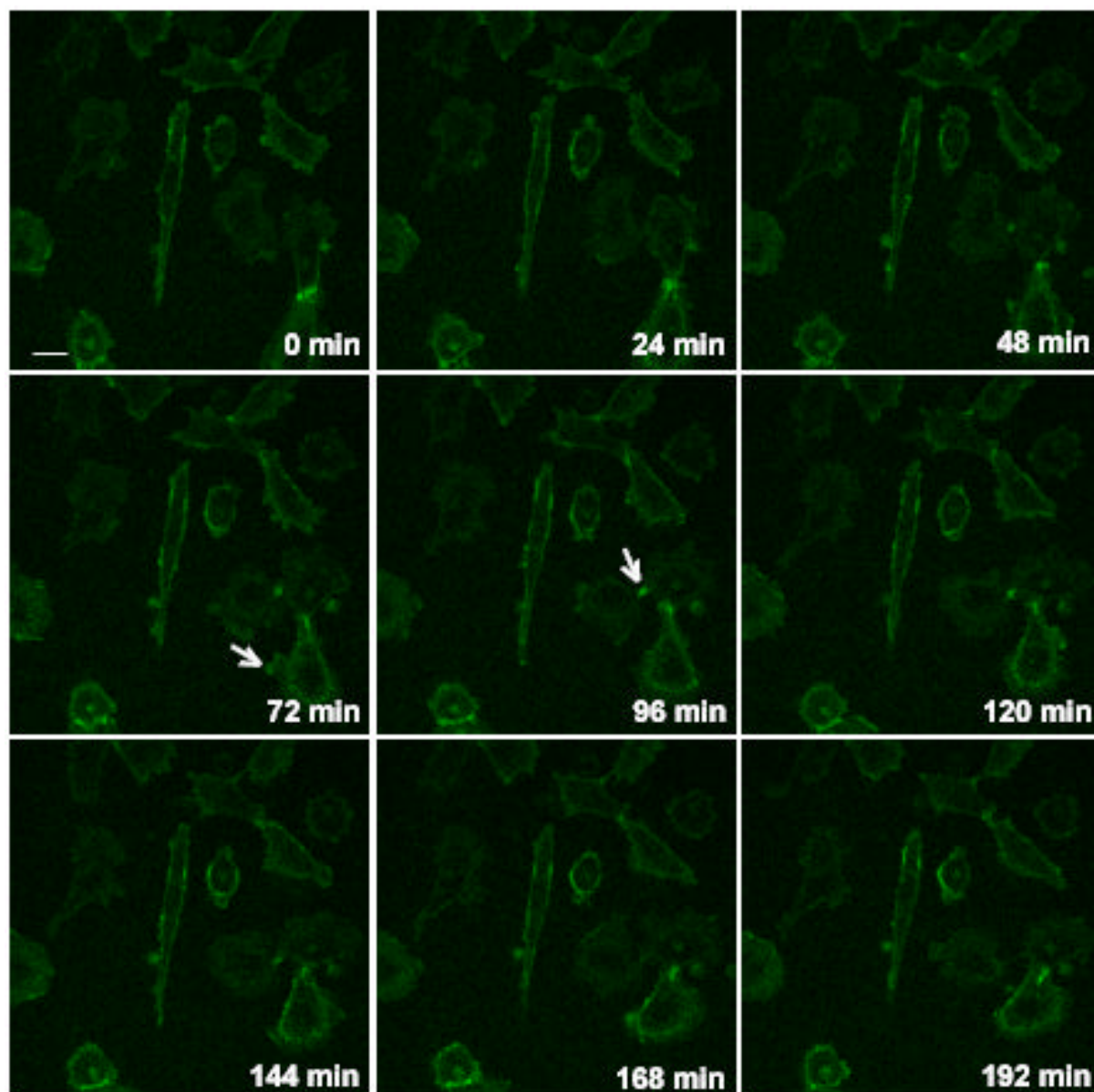


Abb. 48: Einfluss von EGF auf die E-Cadherin-Lokalisation in *wt-EcadEGFP* exprimierenden MDA-MB-435S Zellen

1×10^5 *wt-EcadEGFP* exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden am Vortag auf mit Collagen I beschichteten Gewebekulturschalen mit Glasboden in Hungermedium (DMEM + 0,5% (v/v) BSA) ausgesät. EGF (100 ng/ml) wurde vor Filmstart in frischem Hungermedium zugegeben. Die *wt-EcadEGFP*-Lokalisation und die Migration der Zellen wurden wie unter 2.22.2 (Methoden) aufgenommen und ausgewertet. Dargestellt sind 9 Bilder im Abstand von je 24 min über einen Zeitraum von 192 min. Mit Pfeilen markiert sind E-Cadherin-Ansammlungen in Lamellipodien und kurzzeitig ausgebildete Zell-Zell-Kontakte. Der Balken entspricht 20 μm .

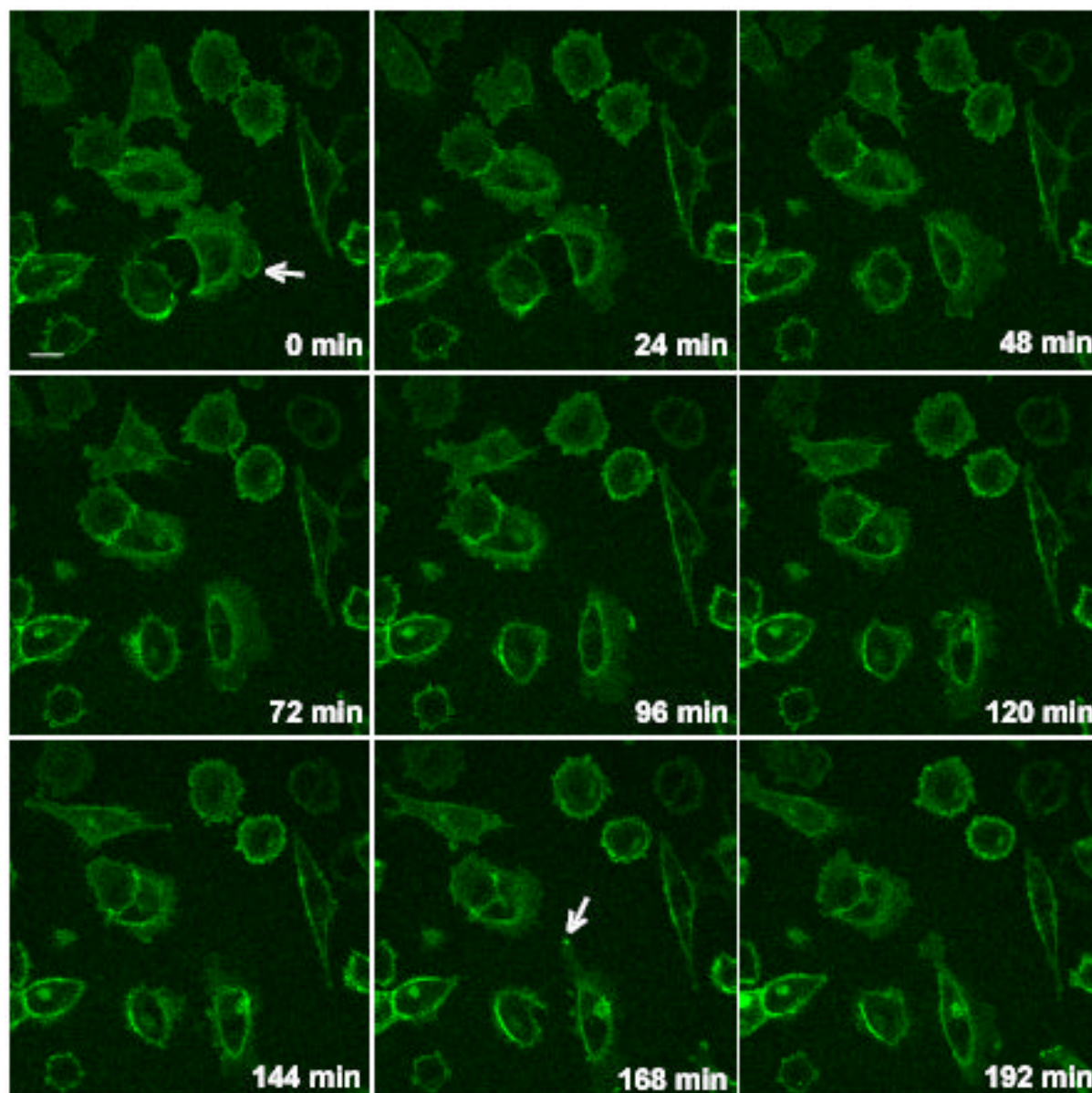


Abb. 49: Einfluss von EGF auf die E-Cadherin-Lokalisation in *p8-EcadEGFP* exprimierenden MDA-MB-435S Zellen

1×10^5 *p8-EcadEGFP* exprimierende MDA-MB-435S Zellen wurden am Vortag auf mit Collagen I beschichteten Gewebekulturschalen mit Glasboden in Hungermedium (DMEM + 0,5% (v/v) BSA) ausgesät. EGF (100 ng/ml) wurde vor Filmstart in frischem Hungermedium zugegeben. Die *wt-EcadEGFP*-Lokalisation und die Migration der Zellen wurden wie unter 2.22.2 (Methoden) aufgenommen und ausgewertet. Dargestellt sind 9 Bilder im Abstand von je 24 min über einen Zeitraum von 192 min. Mit Pfeilen markiert sind in *p8-EcadEGFP* Ansammlungen in Lamellipodien. Der Balken entspricht 20 μm .

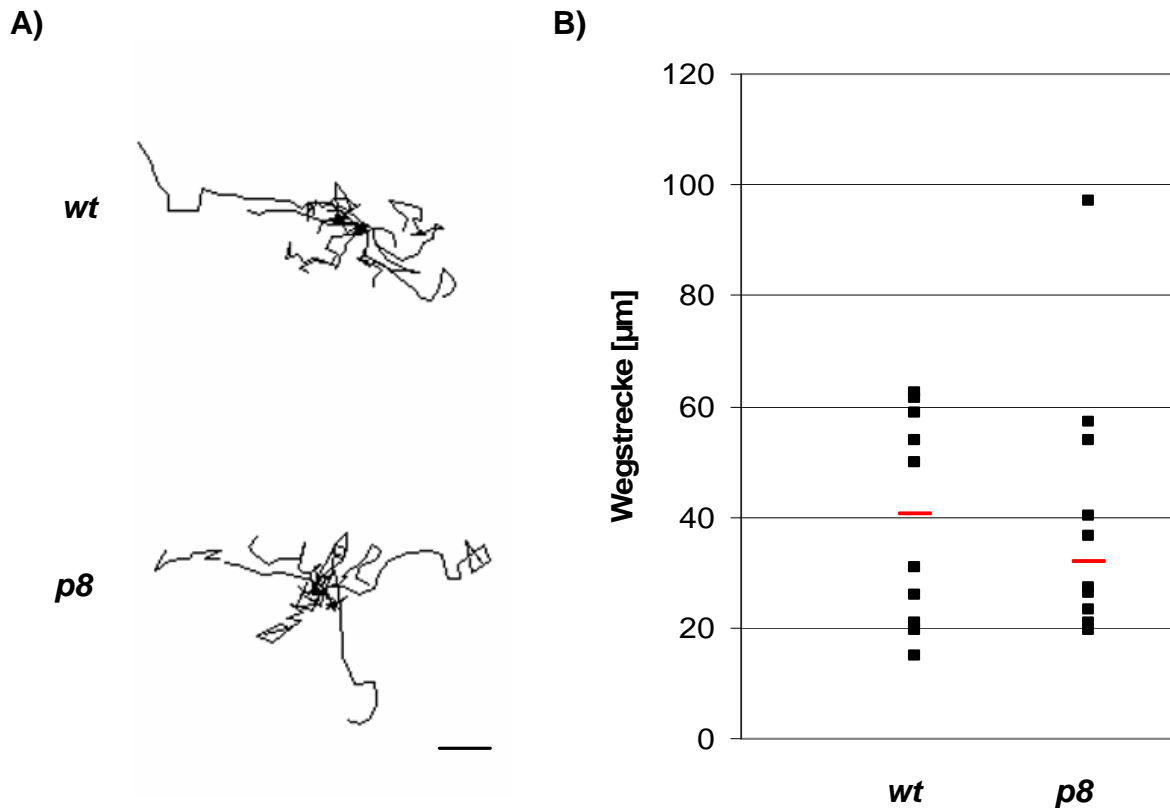


Abb. 50: Wanderungsdistanzen *wt* - und *p8*-EcadEGFP exprimierender MDA-MB-435S Zellen nach EGF-Zugabe

2 h vor Filmstart wurde EGF (100 ng/ml) den Zellen in Hungermedium zugefügt. Die Wanderung von je 10 zufällig ausgewählten Zellen wurde in einem Zeitraum von 4 h mikroskopisch analysiert und photographisch festgehalten. A: Die Wegstrecken [μm] wurden in einer Overlay-Ebene interaktiv nachgezeichnet und die Anfangspunkte in einem gemeinsamen Startpunkt zusammengefasst. Der Balken entspricht 10 μm . B: Die zurückgelegten Wegstrecken der einzelnen Zellen sind in einem Punktdiagramm dargestellt. Rot markiert ist der Median.

Zusammengefasst konnte durch EGFP-markiertes E-Cadherin in Versuchen mit der Inkubationskammer gezeigt werden, dass sich die E-Cadherin Lokalisation in Abhängigkeit vom Mutationsstatus nach Zugabe von Tyrphostin AG1478 bzw. EGF unterschiedlich ändert. *wt*-EcadEGFP ist in unbehandelten Zellen an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Während EGF eine Verteilung von *wt*-EcadEGFP im Zytoplasma, perinukleär und den ausgebildeten Lamellipodien induziert, hat die Zugabe des EGF-Rezeptor-Inhibitors Tyrphostin AG1478 keinen Einfluss auf die *wt*-EcadEGFP Lokalisation. Ein inverses Verhalten konnte für die *p8*-EcadEGFP Lokalisation beobachtet werden. In unbehandelten Zellen, die *p8*-EcadEGFP exprimierten, wurde EGFP-markiertes E-Cadherin am Zellrand, in den Lamellipodien und den lang- und kurzzeitig ausgebildeten Zell-Zell-Kontakten detektiert. EGF hatte keinen Einfluss auf die *p8*-EcadEGFP Verteilung. Im Gegensatz dazu führte Tyrphostin AG1478 zu einer *p8*-EcadEGFP Lokalisation an den stärker ausgebildeten Zell-Zell-Kontakten und perinukleär.

III. Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die EGF-Rezeptor/PI3-Kinase-Signalkaskade

Zellen eines vielzelligen Organismus stehen über ein Netzwerk von Wechselwirkungen miteinander in Verbindung, durch welches sie in der Lage sind, andere Zellen durch ihre Aktivitäten zu steuern oder selbst gesteuert zu werden. Nur so ist ein koordinierter Ablauf der verschiedensten biologischen Prozesse möglich. Aber auch innerhalb einer individuellen Zelle ist es wichtig, dass die Informationsweiterleitung über Signalkaskaden kontrolliert abläuft. Kleinste Veränderungen in den Vorgängen der Signaltransduktion können erhebliche Folgen, wie z.B. unkontrollierte Proliferation, erhöhte Motilität der Zellen und letztlich die Entstehung von Tumoren mit sich bringen. In letzter Zeit häuften sich Daten, dass E-Cadherin eine wichtige Rolle bei der *outside-in* Signalübertragung spielt. So beschreiben Pece und Gutkind (2000), dass E-Cadherin die MAP-Kinase über den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-Rezeptor) aktiviert. Weiterhin verursachen die durch E-Cadherin gebildeten *Adherens Junctions* eine Aktivierung des PI3-Kinase / Akt/PKB Signalweges (Pece *et al.*, 1999). Bis jetzt gibt es aber noch keine Beweise dafür, dass Cadherine-Moleküle selbst Signale weiterleiten können. Dagegen gibt es einige E-Cadherin-assoziierte Proteine, wie z.B. β -Catenin, die eine Rolle bei der Signalweiterleitung spielen.

In vorliegender Arbeit konnte unter Verwendung einer Inkubationskammer gezeigt werden, dass die Zellmotilitäts-assoziierte EGF-Rezeptor/PI3-Kinase-Signalkaskade eine wichtige Rolle bei der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität von MDA-MB-435S Zellen spielt. Während das Migrationsverhalten der mit mutiertem E-Cadherin transfizierten Zellen durch den EGF-Rezeptor Inhibitor Tyrphostin AG1478 sowie den synthetischen PI3-Kinase Inhibitor LY294002 gehemmt werden konnte (Fuchs *et al.*, 2002), führte die Zugabe des Wachstumsfaktors EGF zu einem deutlichen Motilitätsanstieg *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen. Der MAPK Kinase Inhibitor PD98059 hatte keinen Einfluss auf das Motilitätsverhalten der transfizierten Zellen (Fuchs *et al.*, 2002).

Ziel der weiteren molekularbiologischen Untersuchungen der EGF-Rezeptor/PI3-Kinase-Kaskade war es, Moleküle zu finden, welche in die durch mutiertes E-Cadherin-vermittelte Motilität in MDA-MB-435S Zellen involviert sind. Ein denkbarer Therapieansatz wäre anschließend, die Funktion der Proteine und somit

die Motilität der Zellen zu blockieren und dadurch die Invasion der Tumorzellen zu verhindern. Hinsichtlich der Auswirkungen der Inhibitoren Tyrphostin AG1478 und LY294002, sowie des Aktivators EGF wurden Expression und Aktivierungszustand des EGF-Rezeptors, der PI3-Kinase und wichtiger Effektorproteine der EGF-Rezeptor/PI3-Kinase-Signalkaskade (Akt/Proteinkinase B und p42/p44 MAP-Kinase) mittels Western-Blot-Analysen in allen Zelllinien analysiert.

1. Rolle des EGF-Rezeptors in der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität von MDA-MB-453S Zellen

Die funktionelle Bedeutung des EGF-Rezeptors in der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität von MDA-MB-435S Zellen wurde durch Versuche in der Inkubationskammer identifiziert. In der parentalen Zelllinie MDA-MB-435 wurde bereits 1999 von Adelsmann *et al.* eine schwache Expression des EGF-Rezeptors beschrieben. Zunächst sollte geklärt werden, ob mutiertes E-Cadherin einen Einfluss auf die Expression und/oder Lokalisation des EGF-Rezeptors in den mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen hat und dadurch das Motilitätsverhalten der Zellen mit mutiertem E-Cadherin dadurch beeinflusst wird.

1.1. Expressionsstatus des EGF-Rezeptors

Die Expression des EGF-Rezeptors in untransfizierten und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen wurde in Western-Blot- und FACS-Analysen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. In Western-Blot-Analysen wurde der EGF-Rezeptor in allen Zelllinien detektiert (Abb. 51), wobei der Rezeptor in den untransfizierten MDA-MB-435S Zellen kaum exprimiert wurde. Die stärkste Expression konnte in Zellen, die mit *wt*-E-Cadherin transfiziert worden waren, beobachtet werden. Innerhalb der Mutanten wurde der Rezeptor in *del9*-E-Cadherin exprimierenden Zellen geringfügig höher exprimiert als in den beiden anderen Zelllinien. Die Western-Blot-Analysen führen zu der Hypothese, dass E-Cadherin an sich sowie der Mutationsstatus des Zelladhäsionsmoleküls einen Einfluss auf die Expression des Rezeptors in MDA-MB-435S Zellen hat.

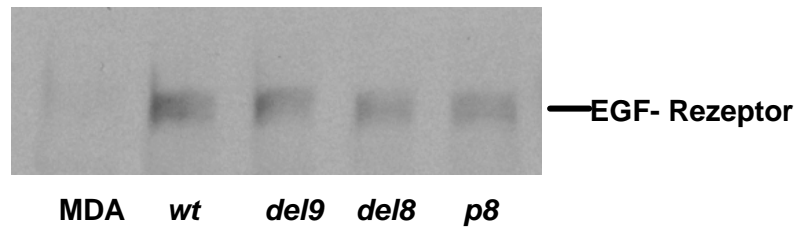


Abb. 51: Nachweis der Expression des EGF-Rezeptors mittels Western-Blot-Analyse

Untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf unbeschichteten Gewebekulturschalen in Vollmedium ausgesät, am nächsten Tag lysiert, die gleiche Proteinmenge auf einem 7,5%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Verdünnung des monoklonalen Maus-Anti-EGF-Rezeptor-Primärantikörpers betrug 1:1000. Die Detektion erfolgte mittels ECL⁺.

Die Methodik der Western-Blot-Analyse erlaubt eine quantitative Aussage über die Gesamtexpression des EGF-Rezeptors in den untersuchten Zellen. Anhand dieses Nachweisverfahrens kann allerdings nicht festgestellt werden, ob es sich dabei nur um den Membran-gebundenen Rezeptor handelt, oder sich der Rezeptor innerhalb der Zelle, z.B. nach einer Internalisierung, befindet. Um der Frage der Membran-Lokalisation des EGF-Rezeptors nachzugehen, wurden FACS-Analysen mit einem spezifischen Antikörper, der nur an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors bindet, durchgeführt. Es zeigte sich auch in diesen Experimenten, dass unterschiedlich viel EGF-Rezeptor in Abhängigkeit vom E-Cadherin Status in den untersuchten Zellen an der Membran lokalisiert ist (Abb. 52). Das Signal der untransfizierten MDA-MB-435S Zellen grenzte sich kaum von der Negativkontrolle ab (Daten nicht gezeigt). Nur in wenigen untransfizierten Zellen konnte der Rezeptor detektiert werden. Im Gegensatz dazu kam es zu einer signifikanten Signalverschiebung in den mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen. Während die Signalintensität *del9*-E-Cadherin exprimierender Zellen am stärksten war, konnte eine Reduktion des Membran-gebundenen Rezeptors in den anderen Zelllinien beobachtet werden. Am auffälligsten war das Ergebnis der *p8*-E-Cadherin exprimierenden Zellen. Neben einem Hauptsignal an EGF-Rezeptor-positiven Zellen war noch ein zweites Signal erkennbar, das sich teilweise mit dem Signal der Negativkontrolle überschneidet. Dieses Resultat war nicht die Folge eines Verlustes des E-Cadherin-Gens in diesen Zellen, da eine parallele FACS-Analyse die E-Cadherin-Expression in allen Zellen eindeutig ergab. Die FACS-Analysen bestätigen das in den Western-Blot-Analysen erhaltene Expressionsmuster des EGF-Rezeptors in untransfizierten und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen, d.h. die

stärkste Expression des EGF-Rezeptors konnte in Zellen, welche *wt*- oder *del9*-E-Cadherin exprimierten, beobachtet werden. In diesen Experimenten war der Unterschied in der EGF-Rezeptor-Expression in Abhängigkeit vom E-Cadherin Status nur gering.

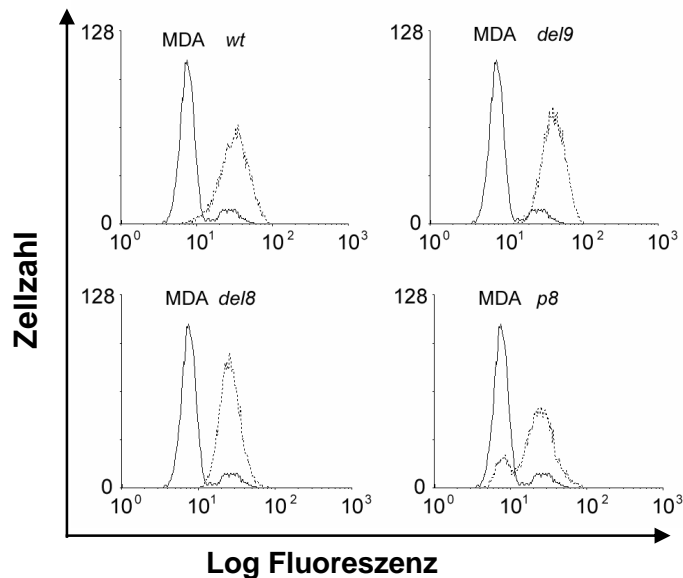


Abb. 52: Nachweis der EGF-Rezeptor Expression in untransfizierten und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen mittels FACS-Analyse

Untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden 1 h mit einem monoklonalen Maus-Anti-EGF-Rezeptor Primärantikörper (Konzentration: 20 µg/ml) auf Eis inkubiert, gewaschen, auf Eis 45 min abgedunkelt mit einem DTAF-gekoppelten Sekundärantikörper (20 µg/µl) inkubiert und mittels FACS-Analyse analysiert. Der primäre Antikörper bindet nur an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors. Durchgezogene Linie: parentale MDA-MB-435S Zellen (MDA). Mit einer gepunkteten Linie sind die mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen dargestellt (*wt*, *del9*, *del8* und *p8*)

1.2 Lokalisation des EGF-Rezeptors

Die Methodik der Western-Blot-Analysen erlaubt eine Aussage über den Expressionsstatus, nicht aber über die Lokalisation des EGF-Rezeptors. FACS-Analysen gaben auch nur Aufschluss über die Menge an Membran-gebundenem Rezeptor, nicht aber über eine mögliche intrazelluläre Verteilung, z.B. nach einer Rezeptor-Internalisierung. Deshalb sollte in Immunfluoreszenz-Analysen die Lokalisation des EGF-Rezeptors ermittelt werden.

In untransfizierten MDA-MB-435S Zellen wurde der EGF-Rezeptor zum Teil an den Zellrändern sowie den Zell-Zell-Kontaktstellen lokalisiert war (Daten nicht gezeigt). Die Immunfluoreszenz-Analyse ist verglichen zur FACS-Analyse eine sensitivere Methodik ist, da sich in der FACS-Analyse die parentalen MDA-MB-435S Zellen kaum von der Negativkontrolle unterschieden. Der EGF-Rezeptors war in *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen deutlich an den Zell-Zell-Kontaktstellen, um

den Zellkern und vereinzelt an den Zellrändern lokalisiert (Abb. 53). Die Expression von mutiertem E-Cadherin mit einer Deletion des Exons 9 resultierte in einem Anstieg der EGF-Rezeptor-Lokalisation sowohl in den Lamellipodien, als auch an den Kontaktstellen der Zellen innerhalb des Klonen und perinukleär (Abb. 53).

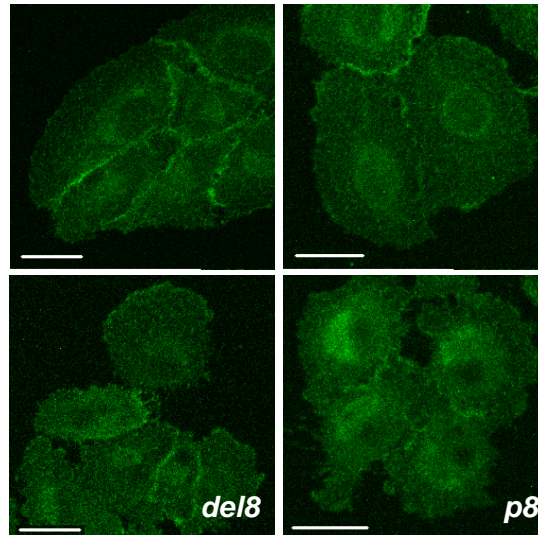


Abb. 53: Nachweis der Lokalisation des EGF-Rezeptors mittels Immunfluoreszenz-Analysen

Untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden in Vollmedium auf Deckgläschen ausgesät, nach 2 Tagen mit Methanol fixiert und der EGF-Rezeptor mit einem monoklonalen Maus-Anti-EGF-Rezeptor Primärantikörper (Verdünnung 1:500) und einem DTAF-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:200) nachgewiesen. Eine Sequenz von optischen Schnitten wurde mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop aufgenommen. Eine repräsentative Projektion von 0,8 μm je Klon ist dargestellt. *wt*: *wt*-E-Cadherin exprimierende MDA-MB-435S Zellen. *del9*: *del9*-E-Cadherin exprimierende MDA-MB-435S Zellen. *del8*: *del8*-E-Cadherin exprimierende MDA-MB-435S Zellen. *p8*: *p8*-E-Cadherin exprimierende MDA-MB-435S Zellen.

Zwischen *del8*- und *p8*-E-Cadherin exprimierenden Zellen konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abb. 53). In beiden Klonen war der EGF-Rezeptor nur schwach an den Zellrändern und den Zellkontaktstellen detektierbar, wobei eine deutliche Reduktion der Signalintensität verglichen mit *del9*-E-Cadherin exprimierenden Zellen zu erkennen war. Zusätzlich zeichneten sich Zellen, die mit *p8*-E-Cadherin transfiziert worden waren, durch eine verstärkte Ansammlung des Rezeptors um den Zellkern aus. Zusammengefasst ergaben die Immunfluoreszenz-Analysen, dass die Lokalisation des EGF-Rezeptors in mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen vom E-Cadherin Status abhängig ist.

2. Stellung der PI3-Kinase in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Signaltransduktion

Als wichtiges *downstream* Signalmolekül des EGF-Rezeptors wurde die Stellung der PI3-Kinase in der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität in MDA-MB-435S Zellen untersucht. Die zentrale Rolle der PI3-Kinase in einer Vielzahl von zellulären Prozessen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben. So ist sie unter anderem in die Zellproliferation (Roche *et al.*, 1994), die Zelldifferenzierung (Magun *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 1998), sowie in die Abläufe der Apoptose (Yao and Cooper, 1995) involviert. Durch den Einsatz des synthetischen PI3-Kinase Inhibitors LY294002 konnte in dieser Arbeit in *in vitro* Versuchen in der Inkubationskammer gezeigt werden, dass die Motilität von Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimierten, durch den Inhibitor gehemmt werden konnte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die PI3-Kinase eine wichtige Rolle in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität spielt. Deshalb sollten die Expression und der Aktivitätsstatus der PI3-Kinase in Abhängigkeit vom E-Cadherin-Status analysiert werden.

2.1 Expressionsstatus der PI3-Kinase

Der Expressionsstatus der PI3-Kinase wurde in untransfizierten und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen untersucht, um zu klären, ob Expressionsunterschiede für die verstärkte Migrationsfähigkeit der Mutanten verantwortlich sind. Hierfür wurde die regulatorische p85-Untereinheit der PI3-Kinase mit spezifischen Antikörpern in Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Parentale MDA-MB-435S Zellen exprimierten die PI3-Kinase schwächer als Zellen, die mit E-Cadherin transfiziert worden waren (Abb. 54). Ein Vergleich der mit E-Cadherin transfizierten Zelllinien untereinander ergab jedoch keinen Unterschied im Expressionsstatus der Kinase. Dies deutet darauf hin, dass eine Transfektion mit E-Cadherin zu einer erhöhten PI3-Kinase Expression führt, der Mutationsstatus jedoch keinen weiteren Einfluss auf das Expressionsmuster hat. Somit können Unterschiede im Expressionsstatus der PI3-Kinase als Ursache für die Motilitätserhöhung in MDA-MB-435S Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimieren,

ausgeschlossen werden. Die Expression der PI3-Kinase an sich ist aber für die Motilität nötig.

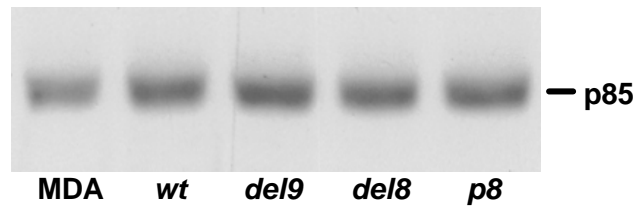


Abb. 54: Nachweis der p85 Untereinheit der PI3-Kinase mittels Western-Blot-Analyse

Untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf unbeschichteten Gewebekulturschalen in Vollmedium ausgesät, am nächsten Tag lysiert, die gleiche Proteinmenge auf einem 7,5%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Der polyklonale Kaninchen-Anti-p85 Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels ECL.

2.2 Aktivitätsstatus der PI3-Kinase

Weiterhin stellte sich die Frage, ob der Aktivitätsstatus der PI3-Kinase eine Rolle in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität spielt, d.h. die Expression in den mit E-Cadherin transfizierten Zellen zwar gleich, die Aktivität jedoch unterschiedlich ist. Deshalb wurde die Aktivität der PI3-Kinase in den verschiedenen Zelllinien mit Hilfe eines radioaktiven Assays bestimmt. In diesen Experimenten wurde Phosphatidylinositol (PI) als Substrat der PI3-Kinase und radioaktiv markiertes $[\gamma^{33}\text{P}]$ ATP eingesetzt. Durch die PI3-Kinase gebildetes Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) wurde anschließend mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Aktivität der Kinase anhand des radioaktiv-markierten Substrates bestimmt. Zur Überprüfung der Funktionalität des Assays wurde der synthetische PI3-Kinase Inhibitor LY294002 in Parallelansätzen in die Reaktion eingesetzt.

Die Versuche ergaben einen ähnlichen Aktivierungsstatus der PI3-Kinase in allen untersuchten Zelllinien (Abb. 55), d.h. der E-Cadherin-Status hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der Kinase. Die Funktion der PI3-Kinase konnte durch den Inhibitor LY294002 fast vollständig blockiert werden, so dass nur noch wenig Inositollipide in der Reaktion phosphoryliert wurden.

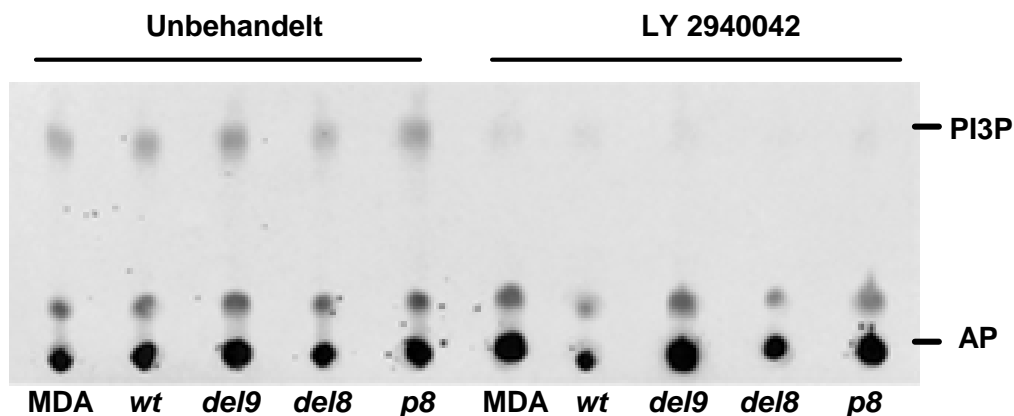


Abb. 55: Radioaktiver Nachweis der PI3-Kinase Aktivität

Je 1×10^6 parentale und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf unbeschichteten Gewebekulturschalen in Vollmedium ausgesät und nach 5 h lysiert. Die PI3-Kinase wurde anschließend mit einem gegen die p85 Untereinheit gerichteten Antikörper präzipitiert, ein radioaktiver PI3-Kinase Assay durchgeführt und das ^{33}P markierte Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Als Funktionskontrolle des Assays wurden $20 \mu\text{M}$ des PI3-Kinase Inhibitors LY294002 vor der Reaktion einem Teil der Ansätze zugefügt. AP: Auftragspunkte.

3 Rolle der Akt/PKB in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität

3.1 *wt*-E-Cadherin erhöht die Aktivität der Akt/PKB in MDA-MB-435S Zellen im Vergleich zu mutiertem E-Cadherin

Die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB gehört wie die MAP-Kinase zu den wichtigen Effektorproteinen der PI3-Kinase und ist unter anderem in Vorgänge, welche Proliferation (Roche *et al.*, 1994), Zelldifferenzierung (Magun *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 1998) und Apoptose-Regulation (Yao and Cooper, 1995) steuern, involviert. Sowohl der Aktivierungszustand als auch die Expression der Kinase wurden mittels Western-Blot-Analysen in untransfizierten und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen bestimmt. Densitometrische Auswertungen ergaben eine zweifache Aktivitätserhöhung der Akt/PKB in *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen im Vergleich zu untransfizierten und mit mutiertem E-Cadherin transfizierten Zellen (Abb. 56, A). Dieses Ergebnis spiegelte sich jedoch nicht in der Gesamtexpression der Kinase wieder (Abb. 56, B), welche in allen Zelllinien ähnlich war, d.h. der Unterschied ist auf eine verstärkte Aktivierung in diesen Zellen zurückzuführen

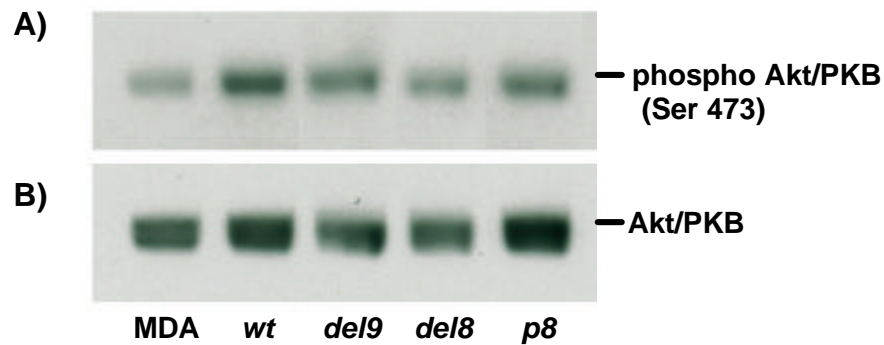


Abb. 56: Nachweis des Expressions- und Aktivierungsstatus der Akt/PBK

Je 6×10^5 untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf unbeschichteten Gewebekulturschalen in Vollmedium ausgesät, nach 5 h lysiert, die gleiche Proteinmenge auf einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose gebロットet. Die Verdünnung der Primärantikörper betrug je 1:1000. Die Detektion erfolgte mittels ECL. A: Western-Blot-Analyse mit einem phosphospezifischen, polyklonalen Kaninchen-Anti-Akt Antikörper, der phosphoryliertes Ser 473 in Akt1 detektiert. B: Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Akt Antikörper, der sowohl die phosphorylierte, als auch die nicht phosphorylierte Form der Kinase detektiert.

3.2 Einfluss verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Aktivierung der Akt/PKB

Der Einfluss der in der Inkubationskammer untersuchten Inhibitoren Tyrphostin AG1478, LY294002, PD98059 und des Wachstumsfaktors EGF auf den Aktivierungszustand der Akt/PKB wurde in Western-Blot-Analysen mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper bestimmt. Der MAPK Kinase Inhibitor PD98059 hatte wie erwartet keinen Effekt auf die Aktivierung und Expression der Akt/PKB (Daten nicht gezeigt). Der PI3-Kinase Inhibitor LY294002 hemmte zwar in Versuchen mit der Inkubationskammer die Motilität von Zellen, die mit mutiertem E-Cadherin transfiziert worden waren, beeinflusste aber die Aktivierung der Akt/PKB nicht (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis führt zur Hypothese, dass die Akt/PKB nicht nur über den PI3-Kinase Weg, sondern auch über eine oder mehrere andere Signalkaskaden phosphoryliert wird.

Der Einfluss von EGF und Tyrphostin AG1478 auf die Akt/PKB wurde in untransfizierten und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen untersucht, da EGF und Tyrphostin AG1478 einen signifikanten Einfluss auf das Motilitätsverhalten E-Cadherin exprimierender MDA-MB-435S Zellen in Versuchen in der Inkubationskammer hatten. Hierzu wurden die Zelllinien 2 min vor der Lyse mit

EGF stimuliert. In parallelen Ansätzen wurde EGF in Kombination mit dem EGF-Rezeptor Inhibitor Tyrphostin AG1478 eingesetzt, um die Funktionalität des Inhibitors nachzuweisen. Es zeigte sich, dass die Stimulation der Zellen mit EGF in allen Klonen zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivierung der Akt/PKB führte. Die durch EGF verursachte Phosphorylierung der Kinase an Ser473 wurde durch Tyrphostin AG1478 wieder vollständig blockiert (Abb. 57, B). Jedoch konnte die in unstimulierten Zellen beobachtete Aktivierung nicht vollständig gehemmt werden, was darauf hindeutet, dass diese erhöhte Aktivierung der Akt/PKB in den *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen nicht über den EGF-Rezeptor/PI3-Kinase Signalweg zu erklären ist. Nach Applikation von EGF änderte sich allerdings das Expressionsmuster der Kinase, wenn auch nicht in demselben Ausmaß wie der Aktivierungsstatus. Die Ursachen hierfür müssen in weiteren Versuchen geklärt werden.

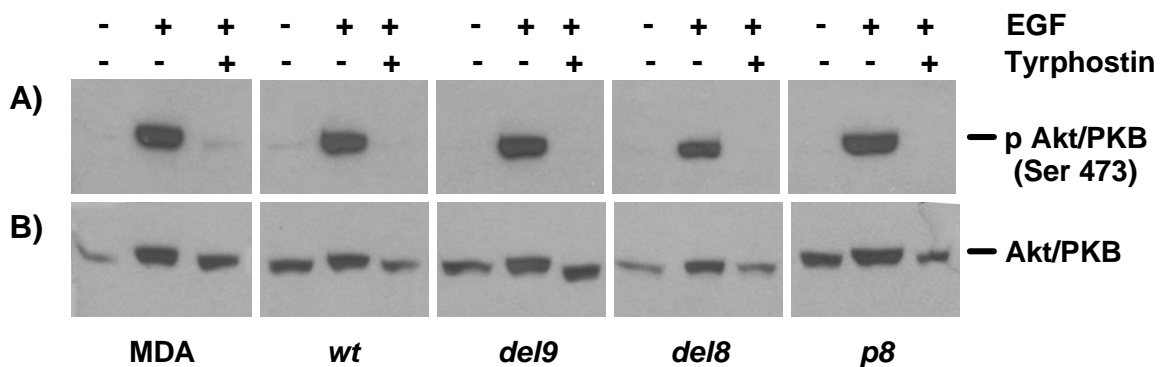


Abb. 57: Aktivitätsstatus der Akt/PKB nach Applikation von EGF bzw. EGF+Tyrphostin AG1478

Je 6×10^5 untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf unbeschichteten Gewebekulturschalen in Hungermedium ausgesät. Für jede Zelllinie wurden 3 Schalen ausgesät, zwei davon nach 5 h entweder 2 min mit EGF (100 ng/μl) oder EGF (100 ng/μl) + 6,3 μM Tyrphostin AG1478 inkubiert und anschließend alle Zellen lysiert. Die gleiche Proteinmenge wurde auf einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Detektion erfolgte wie unter Abb. 56 beschrieben.

4. Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf die p44/p42 MAP-Kinase in MDA-MB-435S Zellen

4.1 Mutiertes E-Cadherin beeinflusst die Aktivität der p44/p42 MAP-Kinase nicht

Die Aktivierung der MAP-Kinase spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion, dem *Spreading* und der Motilität (Fincham *et al.*, 2000; Klemke *et al.*, 1997; Renshaw *et al.*, 1997). Deshalb wurde in vorliegender Arbeit der Frage nachgegangen, welchen Einfluss mutiertes E-Cadherin auf die Expression und Aktivierung der p44/p42 MAP-Kinase in MDA-MB-435S Zellen hat. Analog zu den Untersuchungen der Akt/PKB wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Ein Aktivitätsanstieg der Kinase ließ sich in *wt*- und mutiertes E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen nachweisen. Diese Erhöhung spiegelte sich ebenfalls im Expressionslevel der Kinase wieder, so dass die erhöhte Aktivität in den transfizierten Zellen auf die stärkere Expression zurückzuführen ist (Abb. 58).

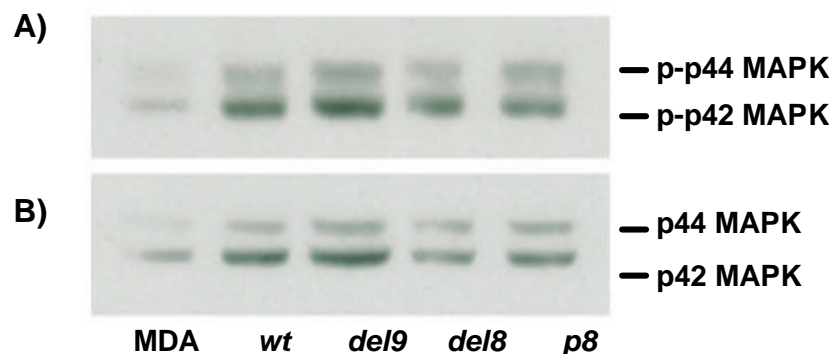


Abb. 58: Nachweis der Expression und Aktivierung der p42/p44 MAP-Kinase

Je 6×10^5 untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf unbeschichteten Gewebekulturschalen in Vollmedium ausgesät, nach 5 h lysiert, die gleiche Proteinmenge auf einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Verdünnung der Primärantikörper betrug je 1:1000. Die Detektion erfolgte mittels ECL. A: Western-Blot-Analyse mit einem phosphospezifischen polyklonalen Kaninchen-Anti-MAP-Kinase Antikörper, der phosphoryliertes Thr 202 und Tyr 204 detektiert. B: Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-MAP-Kinase Antikörper, der sowohl die phosphorylierte als auch die nicht phosphorylierte Form der Kinase detektiert.

4.2 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die p44/p42 MAP-Kinase

Versuche in der Inkubationskammer führten zu dem Ergebnis, dass der MAPK Kinase Inhibitor PD98059, welcher die Threonin- und Tyrosinphosphorylierung der MAP-Kinase verhindert (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995), keinen inhibitorischen Effekt auf die Motilität *del8*-E-Cadherin exprimierender Zellen hat (Fuchs *et al.*, 2002). Aus diesem Grund sollten sowohl die Funktionalität, als auch die Effekte des Kinaseinhibitors auf die Aktivität der p44/p42 MAP-Kinase untersucht werden. Der Inhibitor blockierte bereits nach 2 min fast vollständig die Funktion der MAPK Kinase, d.h. die MAP-Kinasen p42 und p44 wurden kaum bzw. nicht mehr phosphoryliert (Abb. 59).

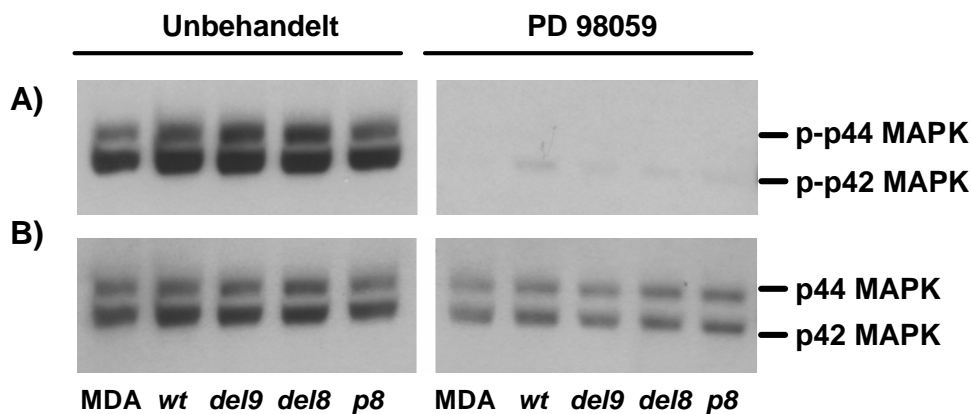


Abb. 58: Einfluss des MAPK Kinase Inhibitors PD98059 auf die p44/p42 MAP-Kinase
 Je 6×10^5 untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf unbeschichteten Gewebekulturschalen in Vollmedium ausgesät. Eine Hälfte der Ansätze wurde 2 min vor der Lyse mit $50 \mu\text{M}$ PD98059 inkubiert. Die Zellen wurden nach 5 h lysiert, die gleiche Menge Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Detektion erfolgte wie unter Abb. 57 beschrieben.

Die noch vorhandene, geringe Aktivität von p42 MAPK kann darin begründet sein, dass die eingesetzte Menge des Inhibitors für eine vollständige Inhibition zu gering war oder noch eine gewisse Restaktivität der Aktivierung der Kinase, welche noch vor der Inhibition erfolgte, vorlag. Der Inhibitor PD98059 hatte keinen Einfluss auf die Expression der MAP-Kinase. Die Funktionalität des Hemmstoffes konnte anhand dieser Experimente nachgewiesen werden.

Der PI3-Kinase Inhibitor LY294002 zeigte keine Auswirkungen auf die Expression und Aktivität der p42/p44 MAP-Kinase (Abb. 59). Der Einfluss von EGF und Tyrphostin AG1478 auf die p44/p42 MAP-Kinase wurden in untransfizierten und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen analog zu den Versuchen, die für Akt/PKB durchgeführt worden waren, untersucht. EGF induzierte eine Aktivitätserhöhung der p42/p44 MAP-Kinase in allen Zelllinien (Abb. 60), wobei der Einfluss des Wachstumsfaktors auf die p42/p44 MAP-Kinase-Aktivität geringer als auf die Akt/PKB war.

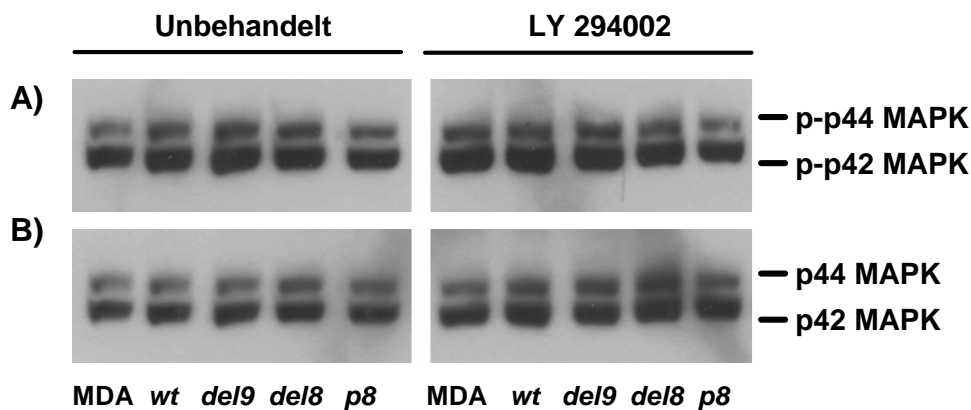


Abb. 59: Einfluss des PI3-Kinase Inhibitors LY294002 auf p44/p42 MAPK

Je 6×10^5 untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf unbeschichteten Gewebekulturschalen in Vollmedium ausgesät. Eine Hälfte der Ansätze wurde 2 min vor der Lyse mit $40 \mu\text{M}$ LY294002 inkubiert. Die Zellen wurden nach 5 h lysiert, die gleiche Menge Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Detektion erfolgte wie unter Abb. 57 beschrieben.

Die Zugabe von Tyrphostin AG1478 verhindert die EGF-vermittelte Aktivitätserhöhung, so dass nur eine Grundaktivierung zu erkennen ist. EGF beeinflusst allerdings auch das Expressionsmuster der MAP-Kinase. Die Ursachen hierfür sind in weiteren Analysen zu klären. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen und der Versuche in der Inkubationskammer deuten darauf hin, dass die p42/p44 MAP-Kinase in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten erhöhten Motilität von MDA-MB-435S Zellen nur eine untergeordnete Rolle spielt.

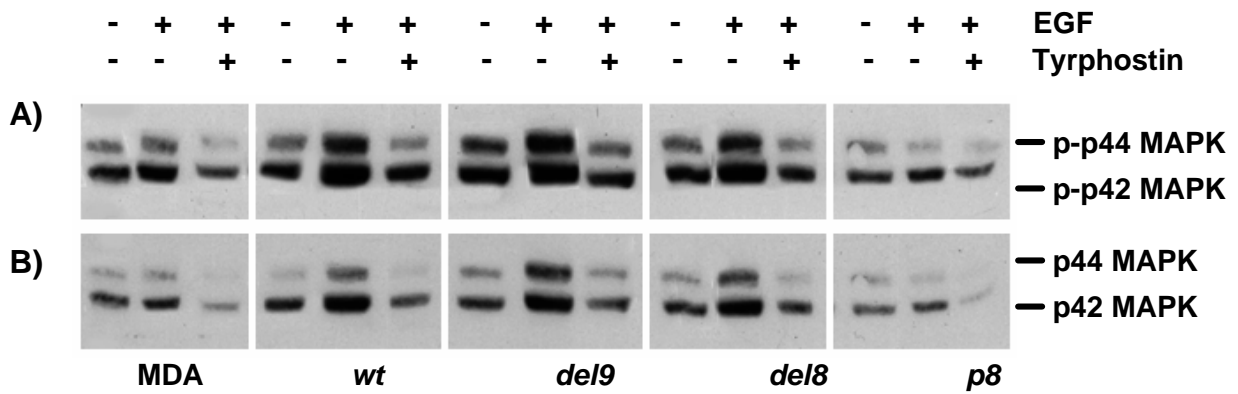


Abb. 60: Aktivitätsstatus der p42/p44 MAP-Kinase nach Zugabe von EGF bzw. EGF+Tyrphostin AG1478

Je 6×10^5 untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf unbeschichteten Gewebekulturschalen in Hungermedium ausgesät. Für jede Zelllinie wurden 3 Schalen ausgesät, zwei davon nach 5 h entweder 2 min mit EGF (100 ng/ μ l) oder EGF (100 ng/ μ l) + 6,3 μ M Tyrphostin AG1478 inkubiert und anschließend alle Zellen lysiert. Die gleiche Proteinmenge wurde auf einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Detektion erfolgte wie unter Abb. 57 beschrieben.

5. Einfluss von Rac1 auf die Motilität und Morphologie von MDA-MB-435S Zellen in Anhängigkeit vom E-Cadherin-Status

Rho-ähnliche GTPasen spielen in den Abläufen der Tumorinvasion und Metastasierung eine wichtige Rolle. Neben den direkten Effekten auf das Zytoskelett sind sie auch in die Signalweiterleitung involviert, was Auswirkungen auf die Zell-Zell-Adhäsion und Motilität von Epithelzellen hat. Um den invasiven Phänotyp epithelialer Tumoren zu verstehen, ist es deshalb wichtig, den Einfluss Rho-ähnlicher GTPasen aufzuklären. Kürzlich wurde gezeigt, dass die zur Familie der Rho-ähnlichen GTPasen gehörenden kleinen GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 in die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion involviert sind (Akhtar *et al.*, 2000; Braga *et al.*, 1997; Kuroda *et al.*, 1998; Nakagawa *et al.*, 2001).

In vorliegender Arbeit sollten daher in parentalen und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen die Expression, die Lokalisation und der Aktivierungsstatus von Rac1, sowie die Effekte von dominant-negativem und konstitutiv-aktivem Rac1 auf die Zellmorphologie und das Aktin-Zytoskelett untersucht werden.

5.1 Expression und Lokalisation von Rac1

Der Expressionsstatus von Rac1, einem *downstream* Molekül der PI3- Kinase, wurde in parentalen und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen mittels Western-Blot-Analysen bestimmt. Die Experimente zeigten, dass Rac1 in allen Zelllinien gleich stark exprimiert wird (Abb. 61) und die Expression weder von E-Cadherin noch dem Mutationsstatus beeinflusst wird. Neben der erwarteten Bande bei 21,5 kDa konnte noch eine zweite, etwas höher laufende Bande detektiert werden. Ob es sich dabei um die Isoform Rac1b handelt, welche von Schnelzer *et al.* (2000) im Mammakarzinom beschrieben wurde, wird in weiteren Analysen geklärt.

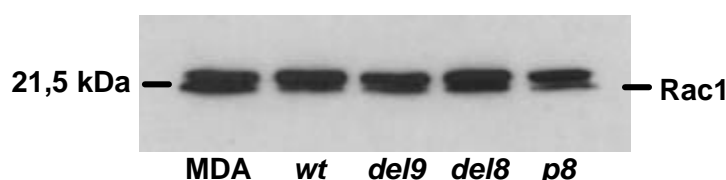


Abb. 61: Nachweis der Rac1-Expression mittels Western-Blot-Analyse

Je $1,5 \times 10^6$ untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf unbeschichteten Gewebekulturschalen in Vollmedium ausgesät, am nächsten Tag lysiert, die gleiche Proteinmenge auf einem 15%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose gebロットet. Der monoklonale Maus-Anti-Rac1 Primäntikörper wurde 1:400 verdünnt. Die Detektion erfolgte mittels ECL.

Die Lokalisation der kleinen GTPase Rac1 wurde in Abhängigkeit vom Mutationsstatus des E-Cadherins mittels Immunfluoreszenz-Analysen nachgewiesen, da nicht nur die Expression, sondern auch die Lokalisation von Rac1 für seine Effekte verantwortlich ist (Sander *et al.*, 1998). In allen fünf untersuchten Zelllinien (MDA, *wt*, *del9*, *del8* und *p8*) war Rac1 perinukleär detektierbar (Abb. 62), wobei in *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien das Signal um den Zellkern am schwächsten war. Weiterhin unterschied sich das Lokalisationsmuster der kleinen GTPase in Abhängigkeit vom E-Cadherin-Status. In parentalen MDA-MB-435S Zellen konnte Rac1 diffus im Zytoplasma und zum Teil in den Lamellipodien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Vereinzelt ließ sich die kleine Rho-GTPase an den Zell-Zell-Kontaktstellen nachweisen. Im Vergleich zu den parentalen MDA-MB-435S Zellen war Rac1 in mit *wt*-E-Cadherin transfizierten Zellen vor allem an den Zell-Zell-Kontaktstellen und vereinzelt am Zellrand lokalisiert (Abb. 62). Im Zytoplasma konnte eine gewisse Präferenz der Rac1-Lokalisation in Richtung Klonrand detektiert werden.

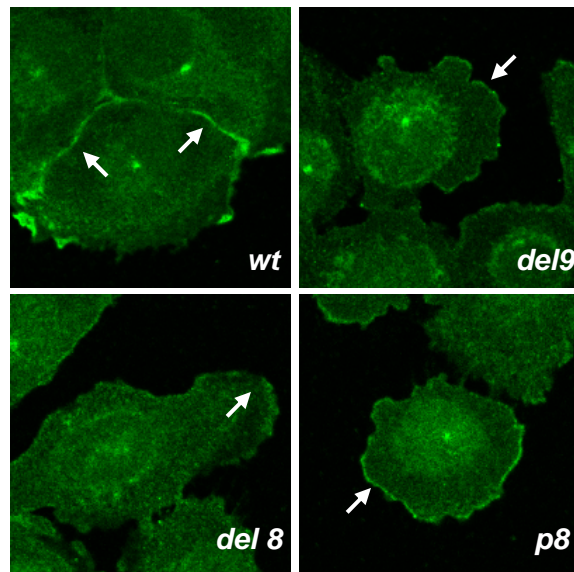


Abb. 62: Nachweis der Lokalisation von Rac1 mittels Immunfluoreszenz-Analysen

Untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden in Vollmedium auf Glasplättchen ausgesät, nach 2 Tagen mit Formaldehyd fixiert und Rac1 mit einem monoklonalen Maus-Anti-Rac1 Antikörper (Verdünnung 1:200) und einem DTAF-gekoppelten sekundären Anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:250) nachgewiesen. Eine Sequenz von optischen Schnitten in 0,1 μm Intervallen wurde mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop aufgenommen. Eine repräsentativer Schnitt je Klon ist dargestellt. Mit Pfeilen markiert ist die Rac1-Lokalisation an den Zell-Zell-Kontaktstellen (*wt*) bzw. in den Lamellipodien (*del9*, *del8* und *p8*). Die Balken entsprechen 20 μm .

Die Lokalisation von Rac1 in MDA-MB-435S Zellen, die mit *del9*-E-Cadherin transfiziert worden waren, unterschied sich deutlich von der Rac1-Lokalisation in *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen. Besonders auffällig war die Lokalisation der kleinen Rho-GTPase verstärkt in den Lamellipodien und reduziert an den Zell-Zell-Kontaktstellen (Abb. 62). Die zytoplasmatische Rac1-Verteilung war in *del9*-E-Cadherin exprimierenden Zellen schwächer als in den anderen Mutanten ausgeprägt. Die Rac1-Lokalisation war in *p8*- und *del9*-E-Cadherin exprimierenden Zellen ähnlich. In *del8*-E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen war Rac1 schwächer in den Lamellipodien detektierbar (Abb. 62).

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass Rac1 trotz gleicher Expression in parentalen und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen unterschiedlich lokalisiert ist. Während Rac1 in *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen vor allem an den Zell-Zell-Adhäsionen detektiert wurde, war es in parentalen und mit mutiertem E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen verstärkt in den Lamellipodien und perinukleär lokalisiert. Dies deutet darauf hin, dass *wt*-E-Cadherin zu einer Lokalisation von Rac1 an den Zell-Zell-Adhäsionsstellen und mutiertes E-Cadherin zu einer verstärkten Lokalisation in den Lamellipodien führt.

5.2 Aktivierungsstatus von Rac1

Rho-ähnliche GTPasen funktionieren als so genannte molekulare Schalter, d.h. sie wechseln zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand. Unter Verwendung eines kommerziellen, nicht-radioaktiven Assays (Upstate Biotechnology modifiziert nach Schnelzer *et al.*, 2000) wurde der Aktivierungsstatus von Rac1 in parentalen und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen bestimmt. Das Prinzip des Assays besteht darin, aktiviertes Rac1 mit Hilfe der spezifischen GTP-Rac1 Bindedomäne der p21-aktivierten Kinase (PAK) aus dem Zelllysate zu präzipitieren (Benard *et al.*, 1999), da nur GTP-Rac1 und nicht GDP-Rac1 an diese Domäne binden kann. Das präzipitierte GTP-Rac1 wurde anschließend mittels Western-Blot-Analysen mit einem spezifischen Rac1 Antikörper nachgewiesen.

Die kleine Rho-GTPase war in allen Zelllinien 5 h nach dem Aussäen der Zellen in Vollmedium gleich stark aktiviert (Daten nicht gezeigt). Tendenziell war die Aktivität in *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen höher im Gegensatz zu den anderen Zelllinien. Diese Präferenz konnte deutlicher beobachtet werden, wenn die Zellen 1 Tag nach dem Aussäen lysiert worden waren. Die Mutanten zeigten einen geringfügigen Anstieg im Vergleich zu den parentalen MDA-MB-435S Zellen. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p=0,41$; *Oneway* Varianz-Analyse).

5.3 Einfluss von Rac1 auf das Aktin-Zytoskelett

Dominant-negatives N17Rac1 bzw. konstitutiv-aktives L61Rac1 (Braga *et al.*, 1997) wurden in weiteren Experimenten eingesetzt, um ihren Einfluss auf die Morphologie und das Aktin-Zytoskelett parentaler und mit *wt*- bzw. *del8*-E-Cadherin transfizierter Zellen zu untersuchen. Die Proteine wurden zunächst in Bakterien exprimiert, aufgereinigt und mit Hilfe der Mikroinjektion in die verschiedenen Zellen injiziert. Die Technik der Mikroinjektion erlaubt es, Proteine in Zellen zu injizieren und anschließend die direkten Effekte dieser Proteine auf das Aktin-Zytoskelett mittels Immunfluoreszenz-Analysen nachzuweisen. Es wurden exemplarisch parentale und mit *wt*- bzw. *del8*-E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen für die Versuche

ausgewählt, um die Effekte auf hoch motile (*de/8*) und weniger motile (*wt*) Zellen, sowie E-Cadherin-negative (parentale MDA-MB-435S Zellen) zu untersuchen.

Die Zelllinien zeichneten sich im nicht injizierten Zustand durch charakteristische Phänotypen aus (Abb. 63, A,D,G), die in früheren Arbeiten unseres Institutes bereits ausführlich beschrieben worden sind (Handschuh *et al.*, 1999; Luber *et al.*, 2000). Durch Rhodamin-gekoppeltes Phalloidin konnte in parentalen Zellen eine Akkumulation der Aktinfasern an den Zell-Zell-Kontakten und vor allem am Zellrand beobachtet werden (Abb. 63, A). Aktinfasern in *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen waren verstärkt an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert und einzelne Fasern verliefen gut organisiert durch die Zellen (Abb. 63, D). Im Gegensatz dazu war die Organisation des Zytoskelettes in den *de/8*-E-Cadherin exprimierenden Zellen weniger strukturiert als in *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen. Zwar konnte teilweise ein Aktinring um die Zellen beobachtet werden, aber die Verteilung der Aktinfasern erschien insgesamt eher ungeordnet (Abb. 63, G).

Die Mikroinjektion von konstitutiv-aktivem L61Rac1 führte in untransfizierten MDA-MB-435S Zellen zu einer erhöhten Aktin-Ansammlung an den Zell-Zell-Kontakten (Abb. 63, B), was auf eine stärkere epitheliale Ausprägung hinwies. Aktinfasern waren innerhalb der Zellen kaum noch zu erkennen. Wurde L61Rac1 in *wt*-E-Cadherin exprimierende Zellen injiziert, so änderten sich die Zellmorphologie und die Organisation des Aktin-Zytoskelettes nur geringfügig (Abb. 63, E). Die Zell-Zell-Kontakte erschienen aufgrund des im Überschuss vorliegenden GTP-Rac1 verstärkt. Zusammengefasst zeigte konstitutiv-aktives L61Rac1 allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Morphologie untransfizierter und mit *wt*-E-Cadherin transfizierter MDA-MB-435S Zellen. Im Gegensatz dazu führte L61Rac1 in *de/8*-E-Cadherin exprimierenden Zellen zu einer deutlichen Veränderung der Zellmorphologie und Struktur des Aktin-Zytoskelettes (Abb. 63, H). Die Zellen verloren weitgehend ihren migratorischen Phänotyp und zeichneten sich durch ein epithelialeres Aussehen aus, d.h. das Zytoskelett und die Morphologie erinnerten mehr an *wt*-E-Cadherin exprimierende als an *de/8*-E-Cadherin exprimierende Zellen. Nur noch vereinzelt waren Lamellipodien und punktuelle Zell-Zell-Adhäsionen im Klon erkennbar.

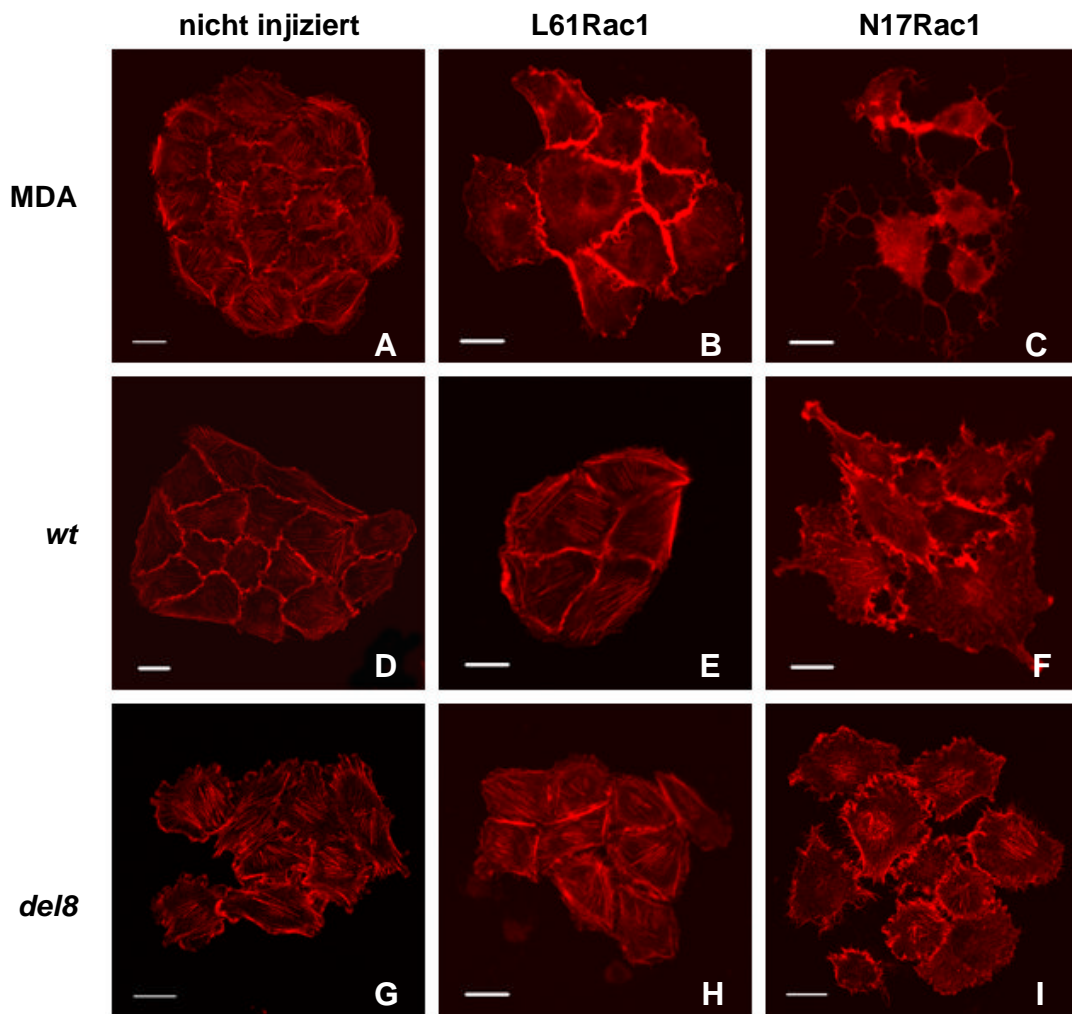


Abb. 63: Einfluss von L61Rac1 und N17Rac1 auf das Aktin-Zytoskelett in Abhängigkeit vom E-Cadherin-Status

Untransfizierte (A-C), mit *wt*- (D-F) oder *del8*-E-Cadherin (G-I) transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden auf CELLocate Coverslips ausgesät und nach 2 Tagen mit L61Rac1 [0,5 µg/µl] oder N17Rac1 [0,5 µg/µl] mikroinjiziert. Nach einer Inkubation von 1 h im Inkubator (37°C/5% (v/v) CO₂) wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und das Aktin-Zytoskelett mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin nachgewiesen. Eine Sequenz von optischen Schnitten in 0,1 µm Intervallen wurde mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop aufgenommen. Alle in B, C, E, F, H und I abgebildeten Zellen wurden injiziert. Ein repräsentativer Schnitt je Klon ist dargestellt. A,D,G: Nicht-injizierte Zellen. B,E,H: Mit L61Rac1 mikroinjizierte Zellen. C,F,I: Mit N17Rac1 mikroinjizierte Zellen. Die Balken entsprechen 20 µm.

Wurde dominant-negatives N17Rac1 in parentale MDA-MB-435S Zellen injiziert, so verschwand der epitheliale Phänotyp der Zellen vollständig (Abb. 63, C) und die Zellen bildeten viele Ausläufer aus. Die gut strukturierte Architektur der Aktinfilamente an den Stellen der Zell-Zell-Adhäsion und innerhalb der Zellen wurde durch N17Rac1 fast vollständig zerstört, und der direkte Zell-Zell-Kontakt wurde nur noch über das fadenartige Netzwerk aufrechterhalten. Im Vergleich zum nicht injizierten Zustand dieser Zellen konnte man nur noch wenige einzelne

Aktinfilamente, die sich über die gesamte Zelle erstreckten, erkennen. Ob diese Effekte allerdings auf einen apoptotischen Zustand hindeuten, muss geklärt werden. Dominant-negatives Rac hatte auf *wt*-E-Cadherin exprimierende Zellen einen deutlichen Einfluss (Abb. 63, F), wenn auch nicht in dem Ausmaß wie auf parentale MDA-MB-435S Zellen. Die Zell-Zell-Kontakte innerhalb eines Klonen waren weitgehend aufgelöst, so dass die Zellen nur noch an wenigen Punkten zueinander in Kontakt standen. Die Aktinfasern verliefen eher unorganisiert durch die Zellen und eine erhöhte Aktinansammlung konnte an dem Leitsaum der Lamellipodien beobachtet werden. Optisch glichen die Klone nicht injizierten Zellen, in denen das Exon 8 im E-Cadherin-Gen deletiert war. Die Mikroinjektion von N17Rac1 in *de/8*-E-Cadherin exprimierende Zellen führte zu keiner signifikanten Veränderung verglichen mit dem ursprünglichen, nicht injizierten Phänotyp dieser Zelllinie (Abb. 63, I). Die Zell-Zell-Kontakte waren auf wenige Punkte reduziert, und die Aktinfasern schienen etwas kürzer und in der Zellmitte lokalisiert zu sein.

Die Ergebnisse der Mikroinjektionsexperimente führen zu der Hypothese, dass in parentalen und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen konstitutiv-aktives L61Rac dem motilen Phänotyp entgegen wirkt, d.h. entweder zu einer epithelialen Transformation führt oder den bereits vorhandenen epithelialen Phänotyp verstärkt. Dominant-negatives N17Rac1 hingegen induziert einen motilen Phänotyp der Zellen, d.h. Zell-Zell-Kontakte werden reduziert und Lamellipodien ausgebildet.

6. Die Expression der Matrix-Metalloproteinase MMP3 wird durch E-Cadherin auf Proteinebene beeinflusst

Matrix-Metalloproteinasen nehmen eine wichtige Stellung in Vorgängen wie der Invasion und Metastasierung maligner Zellen ein. Sie besitzen die Fähigkeit, in ihrer aktiven Form die Ektodomäne bestimmter transmembraner Proteine abzuspalten. Kürzlich wurde gezeigt, dass MMP3 E-Cadherin in der extrazellulären Domäne schneidet, wodurch ein 80 kDa großes lösliches E-Cadherin Fragment entsteht (Davies *et al.*, 2001; Lochter *et al.*, 1997; Noe *et al.*, 2001). In Kooperation mit Prof. Dr. A. Ullrich (Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekularbiologie, Martinsried, München) und Dr. K. Specht (GSF-Pathologie, Neuherberg) konnte

mittels cDNA-Array-Analyse eine differentielle MMP3-Expression in parentalen und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen detektiert werden ($p < 0,001$; *Oneway* Varianz-Analyse). Es wurden zwei verschiedene Filter verwendet: Filter der Firma Axima und Filter der Abteilung Prof. Dr. A. Ullrich, die zum Nachweis der Expression von Signalmolekülen (Tyrosinkinasen, Serin-/Threonin-Kinasen, Phosphatasen, etc.) dienen. Deshalb wurde mittels Western-Blot-Analysen MMP3 auf Proteinebene untersucht.

6.1 Expression der Matrix-Metalloproteinase MMP3 in MDA-MB-435S Zellen

MMP3 wurde im Zellüberstand mittels Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Es konnten signifikante Unterschiede des Proteins in den Zellüberständen in Abhängigkeit von E-Cadherin und dem Mutationsstatus beobachtet werden (Abb. 64; $p = 0,0004$; *Oneway* Varianz-Analyse). Während in mit *p8*-E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen kein Unterschied gegenüber parentalen Zellen detektiert werden konnte ($p = 0,909$; *Oneway* Varianz-Analyse), zeigte sich eine deutliche Reduktion von MMP3 in den Überständen *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen im Vergleich zu den parentalen Zellen. Dieser Unterschied war aber nicht signifikant ($p = 0,378$; *Oneway* Varianz-Analyse).

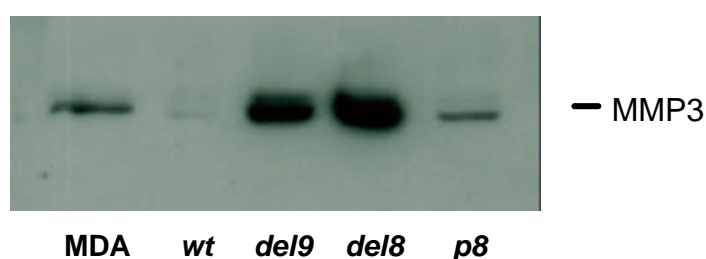


Abb. 64: Nachweis der MMP3-Expression im Überstand mittels Western-Blot-Analyse

Je 3×10^5 untransfizierte und mit E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen wurden in unbeschichteten 24well-Gewebekulturschalen in 500 μ l Vollmedium ausgesät. Nach 3 Stunden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und je 500 μ l DMEM (ohne FCS) zugegeben. Nach drei Tagen wurden 100 μ l der Überstände abgenommen, mit 20 μ l 5xLadepuffer denaturiert, je 25 μ l auf einem 12,5%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Der polyklonale Anti-Kaninchen-MMP3 Primärantikörper wurde 1:400 verdünnt. Die Detektion erfolgte mittels ECL.

Im Gegensatz dazu war eine signifikante Erhöhung von MMP3 im Überstand *de/8*- und *de/9*-E-Cadherin exprimierender Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen zu beobachten (*de/9*: $p=0,011$; *de/8*: $p<0,001$; *Oneway* Varianz-Analyse). In Kinetikstudien konnte bereits 18 h nach dem Aussäen der Zellen dieses Protein-Muster im Überstand nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach 42 h kam es zu keiner weiteren Akkumulation des Proteins im Überstand (Daten nicht gezeigt), was auf die Konfluenz der Zellen zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen ist.

Zusammengefasst zeigen diese ersten Ergebnisse, dass die Matrix-Metalloproteinase MMP3 in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten erhöhten Motilität eine Rolle spielt. In weiteren Versuchen wird der diesem Ergebnis zugrunde liegende Regulationsmechanismus geklärt werden.

E DISKUSSION

Diffus wachsende, epitheliale Tumore, wie z.B. Magenkarzinome und lobulärer Brustkrebs infiltrieren das umliegende Gewebe (Birchmeier and Behrens, 1994; Hirohashi, 1998; Oka *et al.*, 1993). An diesem Vorgang ist eine Vielzahl von Einzelereignissen beteiligt, wie u.a. die Proteolyse, ein Verlust von Zell-Zell-Kontakten und die Motilität. In unserem Institut wurden von Becker *et al.* (1994) in ca. 50% diffuser Magenkarzinome Mutationen im Kalzium-abhängigen, homophilen Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin entdeckt. Die häufigsten Mutationen waren ein Verlust von Exon 8 (*del8*) oder Exon 9 (*del9*). Bei diesen Mutationen handelt es sich um *in frame* Deletionen. Eine Punktmutation im Exon 8 (*p8*; D370A), die eine potentielle Kalzium-Bindungsstelle betrifft, wurde einmal identifiziert. E-Cadherin-Mutationen wurden nicht nur in Magenkarzinomen, sondern auch im lobulären Brustkrebs sowie in gynäkologischen Tumoren gefunden (Becker *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1994; Berx *et al.*, 1998). Analog zum Magenkarzinom wurde die Deletion des Exons 9 im E-Cadherin-Gen in der humanen Brustkrebszelllinie MPE600 identifiziert (Hiraguri *et al.*, 1998; Van de Wetering *et al.*, 2001). Becker *et al.* wiesen in mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen nach, dass E-Cadherin-Mutationen zu einer Reduktion der Adhäsion, einer Erhöhung der Zellmotilität und einer Veränderung der Zellmorphologie führen (Becker *et al.*, 1994; Handschuh *et al.*, 1999).

Obwohl mutierte E-Cadherin-DNA aus diffusen Magenkarzinomen kloniert worden war, wurden in den bisherigen Studien von Becker *et al.* humane MDA-MB-435S Tumorzellen, deren Herkunft kein Magenkarzinom ist, als Empfängerzellen für die Transfektion mit E-Cadherin Expressionskonstrukten verwendet, da diese Zelllinie bereits von anderen Arbeitsgruppen in Studien zur E-Cadherin-Funktion nach einer Transfektion mit E-Cadherin-Expressionskonstrukten verwendet worden war (Frixen *et al.*, 1991; Meiners *et al.*, 1998). MDA-MB-435S Zellen sind für E-Cadherin-Studien geeignet, da sie kein endogenes E-Cadherin besitzen. Die Ursachen für das Fehlen des Proteins in diesen Zellen könnten entweder Methylierungs-assoziiertes *Silencing* (Graff *et al.*, 1995; Kanai *et al.*, 1997) oder die Herabregulierung der E-Cadherin-Genexpression durch Transkriptionsfaktoren wie Snail und Sip1 sein (Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; Comijn *et al.*, 2001).

Basierend auf den von Handschuh *et al.* (1999) beschriebenen Ergebnissen wurde in vorliegender Arbeit weiterführend der Einfluss dieser Tumor-assoziierten

E-Cadherin-Mutationen (*del9*, *del8* und *p8*) auf die Motilität individueller MDA-MB-435S Zellen unter verschiedenen Bedingungen (auf verschiedenen Matrices, nach Applikation der Inhibitoren Tyrphostin AG1478, LY294002, PD98059 und des Wachstumsfaktors EGF) in einer Inkubationskammer *in vitro* untersucht. Dadurch wurde geklärt, ob sich alle Zellen in einem Klon gleich verhalten oder das Migrationsverhalten innerhalb eines Klones unterschiedlich ist, und welchen Einfluss extrazelluläre Matrices, Inhibitoren sowie Aktivatoren auf die Motilität haben. Die Etablierung eines Motilitäts-Assays stellte die Voraussetzung für diese Experimente dar. Der Einsatz von EGFP-markiertem E-Cadherin (*wt*- und mutiertes E-Cadherin) gab Aufschluss über die räumliche und zeitliche Verteilung von mutiertem E-Cadherin während der Zellbewegung. Für diese Experimente wurden E-Cadherin-EGFP (EcadEGFP)-Expressionsvektoren kloniert und stabil in MDA-MB-435S Zellen exprimiert. Weiterhin wurde die Rolle des EGF-Rezeptor-vermittelten Signalweges, der PI3-Kinase-Signalkaskade und des MAP-Kinase-Signalweges untersucht, da diese Signalwege in einer Vielzahl von Zelllinien regulatorisch auf die Zellmotilität einwirken. Die Beteiligung der kleinen GTPase Rac1, der Matrix-Metalloproteinase3 (MMP3), sowie verschiedener Integrine bei der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität wurde mittels molekular- und zellbiologischer Methoden untersucht. Die Identifikation von Signalmolekülen, welche in die durch mutiertes E-Cadherin erhöhte Motilität involviert sind, stellt einen wichtigen Grundlage zur Entwicklung neuer Therapieansätzen zur Behandlung maligner Tumoren mit E-Cadherin Mutationen dar.

1. Mutiertes E-Cadherin führt zu einer erhöhte Motilität von MDA-MB-453S Zellen im Vergleich zu *wt*-E-Cadherin

Das Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin trägt zur Aufrechterhaltung eines epithelialen und nicht-invasiven Phänotyps bei (Frixen *et al.*, 1991). Dieser Phänotyp kann u.a. auch durch eine mesenchymale zur epithelialen Transition aktiv induziert werden (Auersperg *et al.*, 1999). Als Tumorsuppressor wirkt E-Cadherin der Zellmotilität und Invasion entgegen (Frixen *et al.*, 1991). Von Handschuh *et al.* (1999) durchgeführte Wundheilungs-Experimente zeigten, dass mutiertes E-Cadherin zu einer erhöhten Motilität in transfizierten MDA-MB-435S Zellen führt. In vorliegender

Arbeit zeichneten sich nur 30% parentaler MDA-MB-435S Zellen durch ein motiles Verhalten aus, obwohl die Expression von Motilitäts-assoziiertem N-Cadherin in diesen Zellen auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte (Handschuh *et al.*, 2001). Kim und Kollegen (Kim *et al.*, 2000) beschrieben, dass im extrazellulären Teil des N-Cadherins 69 AS für die erhöhte Motilität von Brustkrebszellen und die EMT verantwortlich sind. In unseren MDA-MB-435S Zellen konnten keine Mutationen in diesem Bereich mittels Sequenzanalyse festgestellt werden (Handschuh *et al.*, 2001), weshalb der reduzierten Motilität parentaler MDA-MB-453S Zellen eine andere Ursache zugrunde liegen muss.

Während sich die Motilität *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen nicht von der parentaler Zellen unterschied, resultierte mutiertes E-Cadherin in einem signifikanten Migrationsanstieg der Zellen. Die Ergebnisse der Einzelzellanalyse bestätigten die von Handschuh *et al.* (1999) in Wundheilungs-Experimenten detektierte Motilitätserhöhung durch mutiertes E-Cadherin verglichen zu *wt*-E-Cadherin. Durch den Einsatz der Inkubationskammer konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich parentale MDA-MB-435S Zellen entweder innerhalb eines Klones bewegten oder um die eigene Achse drehten, während sich Zellen mit mutiertem E-Cadherin vom Klon weg bewegten (Daten nicht gezeigt). Innerhalb einer transfizierten Zelllinie unterschieden sich die Zellgeschwindigkeiten von Einzelzellen teilweise um das Zehnfache. Diese Zellen weisen auch einen verstärkt motilen Phänotyp auf (Fuchs *et al.*, 2002). Ursache für die unterschiedlichen Geschwindigkeiten könnte die Analyse asynchroner Zellpopulationen sein, da Zellen während des Zellzyklus Unterschiede in ihrem migratorischen Verhalten aufweisen (Hartmann-Petersen *et al.*, 2000). Denkbar ist auch, dass nur wenige, hoch motile Zellen für die Invasion und Metastasierung *in vivo* verantwortlich sind.

2. Die durch mutiertes E-Cadherin erhöhte Motilität ist abhängig von extrazellulären Bedingungen

Die Migrationsfähigkeit von Zellen ist eine wichtige Voraussetzung physiologischer und pathologischer Prozesse, wie z.B. der embryonalen Entwicklung und der Wundheilung. Sie spielt aber auch eine entscheidende Rolle bei der Tumorinvasion und Metastasierung. Während der Zellmigration werden Interaktionen

zwischen Integrinen und der Extrazellulären Matrix (EZM) am Leitsaum der Zelle ausgebildet und adhäsive Bindungen der Retraktionsfaser wieder gelöst (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Eine mathematische Verbindung zwischen der Zellsubstrat-Adhäsion und der Zellmigration wurde von Paleck *et al.* (1997) definiert. Demzufolge sind die Stärke der Zelladhäsion zur EZM und die Migrations-Fähigkeit der Zelle von der Dichte der Zelloberflächen-Integrine sowie den EZM-Proteinen abhängig.

Zunächst wurde die Adhäsion der Zellen auf verschiedenen Matrices (Poly-Lysin, Collagen I, Fibronectin und Vitronectin) getestet, um geeignete Bedingungen für die Untersuchung des Einflusses von mutiertem E-Cadherin auf die Zellmigration zu etablieren. Zwei der mit E-Cadherin transfizierten Zelllinien wurden exemplarisch ausgewählt: wenig motile, *wt*-E-Cadherin exprimierende und hoch motile, *del8*-E-Cadherin exprimierende MDA-MB-435S Zellen. Die Adhäsion der Zellen auf verschiedenen EZM-Proteinen korrelierte invers mit der Zellmotilität. Während beide Zelllinien auf Poly-Lysin, Fibronectin und Vitronectin stark adhärten und der prozentuale Anteil motiler Zellen äußerst gering war, zeigten *del8*-E-Cadherin exprimierende Zellen im Gegensatz zu *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen auf Collagen I das Verhalten und den Phänotyp motiler Zellen. EZM-Proteine beeinflussen somit negativ die erhöhte Zellmotilität der Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimieren. Aufgrund der Ergebnisse wurde für weitere Versuche in der Inkubationskammer Collagen I als Matrix ausgewählt, da hier die Voraussetzungen für ein optimales Adhäsions-Migrations-Verhältnis gewährleistet und die durch *wt*- und mutiertes E-Cadherin hervorgerufenen Motilitätsunterschiede am deutlichsten zu beobachten waren. Die von anderen Autoren beschriebene transkriptionelle Herabregulation von E-Cadherin durch Collagen I (Menke *et al.*, 2001) konnte in unseren Zelllinien nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt sich dadurch erklären, dass in unseren Zelllinien die E-Cadherin-Expression durch einen β -Aktin Promotor und nicht durch den nativen E-Cadherin-Promotor reguliert wird.

3. Expressionsmuster Collagen-spezifischer Integrine

Integrine spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Migration. Die Expression von mutiertem E-Cadherin induzierte eine signifikante Erhöhung der

Motilität transfizierter MDA-MB-435S Zellen auf Collagen I im Vergleich zu *wt*-E-Cadherin, was die Frage aufwarf, ob mutiertes E-Cadherin einen Einfluss auf das Expressionsmuster Collagen-spezifischer Integrine hat. Mittels FACS-Analysen wurde der Integrin-Status parentaler und mit E-Cadherin transfizierter MDA-MB-435S Zellen analysiert. Ein signifikanter Unterschied im Expressionsmuster konnte für $\alpha\beta 3$ -Integrin, ein Vitronektin- und Fibronektin-Rezeptor, beobachtet werden. Während das Membran-gebundene Integrin-Dimer in *wt*, *del9* und *del8*-E-Cadherin exprimierender Zellen im Vergleich zu parentalen Zellen deutlich erhöht vorlag, konnte eine signifikante Reduktion in *p8*-E-Cadherin exprimierenden Zellen nachgewiesen werden.

Denkbar ist, dass ein Teil der Integrindimere durch mutiertes E-Cadherin sterisch maskiert wird, wodurch der Antikörper nur noch wenige Rezeptoren in der FACS-Analyse detektieren kann. Kozlova und Kollegen (Kozlova *et al.*, 2001) zeigten, dass Anoikis-negative Zellen der intestinalen Karzinomzelllinie Caco-2 durch eine starke transkriptionelle Herabregulation der α v-Integrin Ketten charakterisiert sind (Kozlova *et al.*, 2001). Die Autoren postulieren, dass α v-Integrin ein Signal generiert, welches die Apoptose von Caco-2 Zellen über Ablösen von der extrazellulären Matrix stimuliert, und dass $\alpha\beta 3$ -Integrin ein aktiver Übermittler von Apoptose-stimulierenden Signalen ist, welche als Antwort auf die Unterbrechung von Zell-Matrix-Kontakten induziert werden. Eine Inhibition der aktiven Apoptose-Übermittlung durch eine Regulation des $\alpha\beta 3$ -Rezeptors auf Expressionsebene könnte in *p8*-E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen ebenfalls eine Rolle spielen. In weiteren Versuchen soll den Fragen nachgegangen werden, ob in den verschiedenen Zelllinien eine transkriptionelle Herabregulation für die Unterschiede im Expressionsstatus des $\alpha\beta 3$ -Rezeptors verantwortlich ist oder der Rezeptor nicht an der Membran, sondern im Zytoplasma lokalisiert ist.

Parentale MDA-MB-435S Zellen exprimieren $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, und $\beta 1$ Integrin, welche als Heterodimer die Bindung an Collagen I ermöglichen. Mutationen im E-Cadherin-Gen beeinflussen das Expressionsmuster dieser Integrine in den mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen auf Proteinebene nicht. Diese Integrine spielen somit nur eine untergeordnete Rolle in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität. Untersuchungen mit α v-Integrin führten zu ähnlichen Ergebnissen.

4. Zentrale Stellung des EGF-Rezeptors in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität

4.1 Die durch mutiertes E-Cadherin erhöhte Motilität ist sensitiv gegenüber dem EGF-Rezeptor Inhibitor Tyrphostin AG1478

Die Familie der EGF-Rezeptoren wird häufig im Zusammenhang mit der Invasivität und Metastasierung vieler Tumoren beschrieben. Eine direkte Interaktion des EGF-Rezeptors mit dem E-Cadherin/Catenin-Komplex wurde bereits von mehreren Autoren nachgewiesen. Diese Verbindung wurde durch β -Catenin, welches nach EGF-Zugabe Tyrosin-phosphoryliert worden war, vermittelt (Hoschuetzky *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1997). Um die Bedeutung des EGF-Rezeptors in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität zu klären, wurde der spezifische EGF-Rezeptor Inhibitor Tyrphostin AG1478 in Versuchen in der Inkubationskammer eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Motilität *del8*-E-Cadherin exprimierender MDA-MB-435S Zellen nach Zugabe des Hemmstoffes signifikant auf das Niveau *wt*-E-Cadherin exprimierender MDA-MB-435S Zellen reduziert werden konnte. Im Gegensatz dazu hatte der Inhibitor keine Auswirkungen auf das Migrationsverhalten *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen. Nach Zugabe von EGF wurde eine deutlicher Motilitätsanstieg *wt*-E-Cadherin exprimierender Zellen induziert. Die Motilität der Zellen, welche E-Cadherin mit einer Deletion des Exons 8 exprimierten, konnte durch EGF nicht signifikant erhöht werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der EGF-Rezeptor in den hier untersuchten Zelllinien eine wichtige Funktion bei der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität hat.

Eine direkte Interaktion zwischen dem E-Cadherin/Catenin-Komplex, in dem E-Cadherin mutiert vorliegt, und dem EGF-Rezeptor könnte die Zellmotilität durch einen *Rezeptor-Crosstalk* aktivieren. Die Motilitäts-vermittelnde Funktion anderer Mitglieder der Cadherin-Familie und der Einfluss von zellulären Signalwegen wurden in verschiedenen Studien untersucht. Im Gegensatz zu E-Cadherin wurde für N-Cadherin postuliert, dass es eine epithelial-zu-mesenchymale Transition (EMT) induziert und dadurch die Motilität, Invasion und Metastasierung von Krebszellen verursacht (Nieman *et al.*, 1999; Hazan *et al.*, 2000). Kim und Kollegen wiesen nach, dass die vierte extrazelluläre Domäne von N-Cadherin die EMT und den Anstieg der Motilität vermittelt (Kim *et al.*, 2000). Dadurch wurde gezeigt, dass die Motilitäts-

vermittelnde Funktion von N-Cadherin unterschiedlich zur adhäsiven Funktion ist, welche in der ersten extrazellulären Domäne verankert ist. Die Motilitäts-vermittelnde Funktion von N-Cadherin konnte durch Zugabe des fibroblastären Wachstumsfaktors (FGF)-2 deutlich verstärkt werden (Hazan *et al.*, 2000). Die Autoren postulieren, dass eine Interaktion zwischen N-Cadherin und dem FGF Rezeptor besteht, welche zu dem Anstieg der Motilität führt. Die Hypothese dieser Assoziation wird durch Ergebnisse von anderen Gruppen gestützt (Doherty and Walsh, 1996; Peluso, 2000). Niemann *et al.* erbrachten weiterhin Beweise, dass die N-Cadherin-vermittelte Motilität von Brustkrebszellen durch einen Inhibitor des FGF-vermittelten Signalweges blockiert werden kann (Nieman *et al.*, 1999). Die Involvierung von anderen Mitgliedern der Cadherin-Familie in die Signaltransduktion wurde ebenso für VE-Cadherin gezeigt, welches einen Komplex mit β -Catenin, der PI3-Kinase und dem VEGFR-2 bildet. Dadurch wurden die Akt/PKB und somit das endotheliale Zellüberleben aktiviert (Carmeliet *et al.*, 1999).

4.2 Expression und Lokalisation des EGF-Rezeptors sind vom E-Cadherin-Status abhängig

Mittels Western-Blot- und FACS-Analysen wurden der Expressionsstatus und die zelluläre Verteilung des EGF-Rezeptors in parentalen und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen ermittelt. Der Rezeptor wurde in parentalen MDA-MB-435S Zellen kaum exprimiert. Diese Beobachtungen korrelierten mit den Daten, die von Adelsmann und Kollegen für die ursprüngliche MDA-MB-435 Zelllinie (die in vorliegender Arbeit verwendete Zelllinie ist ein Subklon dieser Zelllinie) gezeigt worden waren (Adelsmann *et al.*, 1999). Die Transfektion von E-Cadherin führte in MDA-MB-435S Zellen zu einem signifikanten Expressionsanstieg des Rezeptors, wobei der E-Cadherin-Status *per se* keinen weiteren signifikanten Einfluss auf die Expression hatte. Durch Immunfluoreszenz-Analysen wurde die Lokalisation des EGF-Rezeptors in Abhängigkeit von E-Cadherin und den verschiedenen Mutationen nachgewiesen. Während der Rezeptor in *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen vor allem an den Zell-Zell-Kontaktstellen detektiert werden konnte, war er in Zellen, die eine Mutation im Exon 8 trugen (*del8* und *p8*), verstärkt perinukleär und im Zytoplasma lokalisiert. Denkbar ist, dass der Rezeptor nach erfolgter Dimerisierung

in diesen Zellen durch eine rasche Internalisierung von der Zelloberfläche in die frühen Endosomen transportiert wird und dort mittels Immunfluoreszenz-Analysen detektiert werden kann. Das Muster der zellulären EGF-Rezeptor-Verteilung korrelierte mit den Ergebnissen, die für die E-Cadherin und β -Catenin Lokalisation in diesen Zelllinien in unserer Arbeitsgruppe beschrieben worden waren (Handschuh *et al.*, 1999; Lubber *et al.*, 2000). Die in vorliegender Arbeit untersuchten mutierten E-Cadherine besitzen eine intakte β -Catenin Bindedomäne und können somit Komplexe mit β -Catenin ausbilden (Lubber *et al.*, 2000). Weiterführende Versuche sollen der Hypothese einer direkten Interaktion zwischen dem E-Cadherin/Catenin-Komplex, in dem E-Cadherin mutiert vorliegt, und dem EGF-Rezeptor z.B. durch Ko-Immünpräzipitationen nachgehen und die Ursache der durch die Immunfluoreszenz gezeigten zytoplasmatischen Lokalisation des EGF-Rezeptors aufklären.

5. Die durch mutiertes E-Cadherin erhöhte Motilität ist sensitiv gegenüber dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002

Der EGF-Rezeptor wurde als wichtiges Molekül in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten erhöhten Motilität von MDA-MB-435S Zellen identifiziert. Dies warf die Frage auf, welche Rolle weitere Moleküle der EGF-Rezeptor/PI3-Kinase Signalkaskade in diesem Zusammenhang spielen. Adelsmann und Kollegen (Adelsmann *et al.*, 1999) beschrieben, dass die Stimulation parentaler MDA-MB-435 Zellen mit dem Wachstumsfaktor EGF eine Aktivierung der PI3-Kinase induziert, weshalb die Stellung der PI3-Kinase in MDA-MB-435S Zellen, die mit E-Cadherin transfiziert worden waren, untersucht wurde. Experimente in der Inkubationskammer ergaben, dass die durch mutiertes E-Cadherin erhöhte Zellmotilität nach Zugabe des spezifischen PI3-Kinase Inhibitors LY294002 signifikant gehemmt werden konnte. Der Einfluss der Inhibitors auf *wt*-E-Cadherin exprimierende Zellen war nicht signifikant. Molekularbiologische Methoden ergaben keinen Expressionsunterschied der PI3-Kinase in den mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen. Signifikante Unterschiede in der Aktivierung der PI3-Kinase konnten in den mit *wt*- oder mutiertem E-Cadherin transfizierten Zellen nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Grundaktivität, nicht aber eine

Aktivitätserhöhung der PI3-Kinase durch E-Cadherin für die Motilitätserhöhung notwendig ist.

Woodfield und Kollegen (Woodfield *et al.*, 2001) zeigten, dass die regulatorische p85 Untereinheit der PI3-Kinase mit dem β -Catenin/E-Cadherin-Komplex assoziiert ist. Dabei handelt es sich um eine direkte Bindung, in welche die Amino-terminale Src-homologe (SH) Domäne 2 der regulatorischen PI3-Kinase Untereinheit involviert ist. Die Regulation dieser Interaktion erfolgt über Tyrosin-Phosphorylierung. Eine direkte Interaktion der p85 Untereinheit mit β -Catenin wird in unserem Zellkultursystem noch untersucht. In mehreren Studien wurde eine Translokation der PI3-Kinase in den Zellkern beschrieben (zusammengefasst in Martelli *et al.*, 1999). Von β -Catenin ist bekannt, dass es in den Zellkern transloziert und dort mit Mitgliedern der TCF/LEF-1 Transkriptionsfaktorfamilie interagiert (Fagotto *et al.*, 1998; Seidensticker und Behrens 2000). Woodfield und Kollegen postulierten, dass eine PI3-Kinase/ β -Catenin Interaktion den Transport der PI3-Kinase in den Zellkern vermittelt (Woodfield *et al.*, 2001), wodurch die PI3-Kinase an Vorgängen der nukleären Signalweiterleitung teilnimmt. Dies könnte zu einer erhöhten oder modifizierten β -Catenin-vermittelten Transkription führen.

6. Erhöhte Aktivierung der Akt/PKB in *wt*-E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen im Vergleich zu mutiertem E-Cadherin

Die Akt/PKB gehört zu den Haupteffektorproteinen der PI3-Kinase (Coffer *et al.*, 1998). Es wurde kürzlich gezeigt, dass die Akt/PKB durch Ausbildung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsionen aktiviert wird (Pece *et al.*, 1999). In vorliegender Arbeit konnte durch Western-Blot-Analysen gezeigt werden, dass die phosphorylierte Form der Akt/PKB in *wt*-E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen im Vergleich zu den Mutanten etwa zweifach erhöht ist. Es wurden keine Unterschiede in der Expression, sondern nur im Phosphorylierungsstatus der Akt/PKB detektiert. Der spezifische PI3-Kinase Hemmstoff LY294002 konnte in Versuchen in der Inkubationskammer die Motilität der mit mutiertem E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen (*de/8*) signifikant inhibieren, hatte aber keinen Einfluss auf die Aktivierung und Expression der Akt/PKB. Der Wachstumsfaktor EGF führte zu einem deutlichen Anstieg der Akt/PKB-Phosphorylierung, die nach

Applikation des EGF-Rezeptor Inhibitors Tyrphostin AG1478 wieder auf den Ausgangszustand, aber nicht weiter reduziert werden konnte. Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass in parentalen und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen neben der PI3-Kinase andere Signalmoleküle in die Regulation der Akt/PKB-Aktivierung involviert sind. Während bereits gezeigt wurde, dass die Akt/PKB in die Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts der PI3-Kinase involviert ist (Coffer *et al.*, 1998), ist ihre Rolle bei der Regulation der zellulären Motilität noch nicht eindeutig geklärt.

7. Untergeordnete Rolle der p44/p42 MAP-Kinase in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten Motilität

Die p44/p42 MAP-Kinase, welche unter anderem in die Zellmotilität involviert ist (Klemke *et al.*, 1997), ist neben der Akt/PKB ein weiterer *downstream* Effektor der PI3-Kinase (Coffer *et al.*, 1998). Kürzlich erschienene Daten deuten darauf hin, dass die MAP-Kinase durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen aktiviert wird, wobei den Integrinen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zukommt (Zhu and Assoian, 1995; Fincham *et al.*, 2000). Pece und Gutkind beschreiben eine durch die Interaktion von E-Cadherin und dem EGF-Rezeptor vermittelte Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges (Pece and Gutkind, 2000). In unserem Zellkultursystem konnten mittels Western-Blot-Analysen keine Unterschiede in Phosphorylierungsstatus und dem Expressionslevel der p44/p42 MAP-Kinase in Abhängigkeit vom E-Cadherin-Status beobachtet werden. Der inhibitorische Effekt des MAP-Kinase Inhibitors PD98059 auf die Aktivität der MAP-Kinase und somit die Funktionalität wurden zwar auf molekularbiologischer Ebene eindeutig nachgewiesen, aber in Versuchen in der Inkubationskammer hatte der Inhibitor keine signifikanten Auswirkungen auf das Motilitätsverhalten *wt*- und *de/8*-E-Cadherin exprimierender MDA-MB-435S Zellen. Dies führt zu der Hypothese, dass die p44/p42 MAP-Kinase nur eine untergeordnete Rolle bei der durch mutiertes E-Cadherin erhöhten Zellmotilität spielt.

8. Die Matrix-Metalloproteinase 3 wird vom E-Cadherin-Status beeinflusst

In Kooperation mit Prof. Dr. A. Ullrich (Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekularbiologie, Martinsried, München) und Dr. K. Specht (GSF-Pathologie, Neuherberg) konnte mittels cDNA-Array-Analyse eine differentielle Genexpression von MMP3 in E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen gezeigt werden. Deshalb wurde MMP3, das eine wichtige Rolle für die Invasion von Tumorzellen spielt, auf Proteinebene in den verschiedenen Zelllinien untersucht. Nach einer dreitägigen Zellkultivierung konnte eine verstärkte Akkumulation des Proteins im Zellüberstand von *del8-* und *del9-*E-Cadherin exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war MMP3 im Überstand *wt-*E-Cadherin exprimierender Zellen kaum detektierbar.

Die Funktion transmembraner Moleküle wird durch den Verlust einer ihrer Domänen verändert oder inhibiert. Matrix-Metalloproteinasen besitzen neben ihrer Funktion, Matrixproteine zu degradieren die Fähigkeit, die Ektodomäne bestimmter transmembraner Proteine abzuspalten. Mehrere Arbeitsgruppen haben kürzlich gezeigt, dass die MMPs Stromelysin-1 (MMP3) und Matrylisin (MMP7) E-Cadherin in der extrazellulären Domäne schneiden, wodurch ein 80 kDa großes lösliches E-Cadherin Fragment entsteht (Davies *et al.*, 2001; Lochter *et al.*, 1997; Noe *et al.*, 2001). Der noch vorhandene Membran-gebundene Teil des E-Cadherins wird anschließend proteolytisch abgebaut (Ito *et al.*, 1999). Diese E-Cadherin-Abspaltungen resultieren in der Translokation von β -Catenin von der Zellmembran ins Zytoplasma, wo es akkumuliert (Lochter *et al.*, 1997). Das Fehlen des Membran-gebundenen Fragments löst die Invasion aus und führt zum Verlust der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion (Noe *et al.*, 2001). Die erhöhte Invasion wird dabei vermutlich durch den Abbau der intrazellulären E-Cadherin-Domäne induziert, da E-Cadherin-Mutanten, welche nur aus einer intrazellulären Domäne bestehen, zwar keinen Zell-Zell-Kontakt ausbilden können, aber die Funktion der Invasionsinhibition noch besitzen (Sasaki *et al.*, 2000).

MMPs spielen eine wichtige Rolle bei der Kolon-Karzinogenese. Im humanen kolorektalen Karzinom wurde eine Überexpression von MMP7 in 80% der untersuchten Fälle detektiert (Brabletz *et al.*, 1999). Dabei spielt die MMP nicht nur im frühen Stadium des Tumorwachstums, sondern auch in späteren Stufen der Invasion und Metastasierung eine wichtige Rolle. Eine transkriptionelle Regulation

von MMP7 durch β -Catenin konnte in diesen Karzinomen nachgewiesen werden. β -Catenin akkumulierte aufgrund eines Mutations-bedingten Funktionsverlustes des Tumorsuppressors APC im Zytoplasma und translozierte in den Zellkern. Dort bildete es mit dem Transkriptionsfaktor Tcf4 einen Komplex und vermittelte somit die Transkription von MMP7 (Brabletz *et al.*, 1999). Brabletz und Kollegen beschrieben weiterhin potentielle TCF-Bindungsstellen in der Promotorregion von MMP3. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurden gezeigt, dass in MDA-MB-435S Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimierten, eine Dislokalisierung von β -Catenin verstärkt im Zytoplasma und perinukleär vorlag (Handsuh *et al.*, 1999; Luber *et al.*, 2000). In Magenkarzinomen wurde eine Hochregulation von MMP3 in 27% der untersuchten Fälle entdeckt (Murray *et al.*, 1998).

In weiterführenden Versuchen soll geklärt werden, ob in den mit mutiertem E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen die MMP3-Regulation über β -Catenin erfolgt und in welcher Weise das abgespaltene E-Cadherin-Fragment einen Einfluss auf die Motilität hat. Zusätzlich soll geklärt werden, ob es sich bei dem im Überstand vorliegenden Protein um die aktivierte Form von MMP3 handelt. Die Applikation von MMP3-Inhibitoren wird zusätzlich Aufschluss über die Funktion des Proteins in der durch mutiertes E-Cadherin-vermittelten erhöhten Motilität geben.

9. Die Lokalisation und Aktivierung von Rac1 ist vom E-Cadherin-Status abhängig

Die Funktion der kleinen GTPase Rac1, ein Effektorprotein der Akt/PKB, wurde in der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität in MDA-MB-435S Zellen, die mit E-Cadherin transfiziert worden waren, untersucht. Rac1 gehört zur Familie Rho-ähnlicher GTPasen und agiert als molekularer Schalter, d.h. es findet ein Wechsel zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Status statt. Rac1 ist nicht nur in die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Hall *et al.*, 1998), d.h. die Ausbildung von Lamellipodien und Membrankräuselungen involviert, sondern nimmt auch eine wichtige Stellung in der Entstehung und Aufrechterhaltung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsionen ein (Akhtar *et al.*, 2000; Braga *et al.*, 1997; Kuroda *et al.*, 1998; Nakagawa *et al.*, 2001; Taikashi *et al.*, 1997). In kürzlich durchgeführten Studien mit EGFP- bzw. GFP-

markierten Rac1-Fusionsproteinen konnte gezeigt werden, dass Rac1 und E-Cadherin sowohl an den Zell-Zell-Kontakten, als auch nach deren Auflösung z.B. durch Kalzium-Entzug, im Zytoplasma kolokalisieren (Akthar *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2001). Nakagawa und Kollegen beschrieben weiterhin, dass Rac1 durch die Entstehung von Zell-Zell-Adhäsionen aktiviert wird (Nakagawa *et al.*, 2001).

In vorliegender Arbeit wurde in parentalen und mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen eine ähnliche Rac1-Expression detektiert. Die Aktivitätsanalyse ergab im Vergleich zu parentalen Zellen eine tendenziell höhere Aktivierung in Zellen, die mit E-Cadherin transfiziert worden waren. Dieses Ergebnis war aber nicht signifikant. Innerhalb der Transfektanten war Rac1 in *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen geringfügig stärker aktiviert. Im Gegensatz zum Expressions- und Aktivierungsmuster konnte ein deutlicher Unterschied der Rac1-Lokalisation in Abhängigkeit vom E-Cadherin- Expressions- und Mutationsstatus beobachtet werden. Während in *wt*-E-Cadherin exprimierenden Zellen Rac1 verstärkt an den Zell-Zell-Adhäsionen detektiert werden konnte, wurde die kleine GTPase in Zellen, die mit mutiertem E-Cadherin transfiziert worden waren, vor allem perinukleär, am Zellrand und in den Lamellipodien nachgewiesen. Diese Ergebnisse korrelieren mit den in unserer Arbeitsgruppe erhaltenen Daten für die E-Cadherin-Lokalisation in Abhängigkeit des Mutationsstatus (Handschuh *et al.*, 1999; Luber *et al.*, 2000). Dies führt zur Hypothese, dass Rac1 und mutiertes E-Cadherin im Zytoplasma assoziiert sind und die Lokalisation von Rac1 eine Rolle bei der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Motilität spielt.

Mikroinjektionsexperimente mit dominant-negativem N17Rac1 und konstitutiv-aktivem L61Rac1 und die anschließende Färbung des Aktin-Zytoskelettes ermöglichten Aussagen über den Einfluss von Rac1 auf das Aktin-Zytoskelett in Abhängigkeit von *wt*- und *del8*-E-Cadherin in MDA-MB-435S Zellen. L61Rac1 induzierte in *wt*-E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen eine erhöhte Aktinansammlung an den Zell-Zell-Kontakten und eine verstärkte Zell-Zell-Adhäsivität. N17Rac1 hingegen führte zu einer teilweisen Auflösung der Zell-Zell-Adhäsionen und resultierte morphologisch in einem motilen Phänotyp mit charakteristischen Lamellipodien. Während L61Rac1 in *del8*-E-Cadherin exprimierende Zellen weitgehend den motilen Phänotyp inhibierte, d.h. Zell-Zell-Kontakte wurden vermehrt ausgebildet und die Formation von Lamellipodien wurde reduziert, hatte N17Rac1 keinen signifikanten Einfluss auf *del8*-E-Cadherin

exprimierende Zellen. Die Effekte von L61Rac1 und N17Rac1 waren in parentalen MDA-MB-435S Zellen deutlicher ausgeprägt als in den Transfektanten. Ursache hierfür könnte das Fehlen von E-Cadherin-Komplexen sein, in die Rac1 z.B. über IQGAP1 involviert ist.

In *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Zellen induzierte konstitutiv-aktives Rac1 (V12Rac1) die Akkumulation von E-Cadherin, β -Catenin und dem Aktin-Zytoskelett an den Zell-Zell-Adhäsionen (Takaishi *et al.*, 1997). Dominant-negatives Rac1 (N17Rac1) inhibierte diese Akkumulation bzw. führte zur Dislokalisierung von E-Cadherin und seinen assoziierten Bindungspartnern von den Zell-Zell-Kontaktstellen (Braga *et al.*, 1997; Takaishi *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1997; Jou und Nelson, 1998). Die Effekte von N17Rac1 werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Akhtar und Kollegen konnten die oben beschriebenen Auswirkungen von dominant-negativem Rac1 nicht bestätigen (Akhtar *et al.*, 2000). Die Effizienz dominant-negativer Mutanten Rho-ähnlicher GTPasen und somit die Funktion von Rac1 variieren allerdings abhängig vom Reifungsgrad der Zell-Zell-Kontakte und dem Zelltyp (Braga *et al.*, 1999; Hordijk *et al.*, 1997; Takaishi *et al.*, 1997; Potempa *et al.*, 1998). Dies erklärt die in der Literatur unterschiedlich beschriebenen Ergebnisse.

Kürzlich wurde in der Literatur beschrieben, dass IQGAP1, ein Effektor von Rac1 und Cdc42, eine wichtige Rolle bei der Dissoziation von Zell-Zell-Adhäsionen spielt. IQGAP1 assoziiert mit dem Aminoterminus (AS 1-183) von β -Catenin, in welcher Region sich auch die Bindedomäne für α -Catenin befindet (Fukata *et al.*, 1999). Dies bedeutet, dass IQGAP1 und α -Catenin um die Bindung an β -Catenin konkurrieren. Fukata und Kollegen (Fukata *et al.*, 2001) konnten zeigen, dass nach 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) Zugabe sowohl die Menge an GTP-Rac1, als auch die Rac1-IQGAP1-Interaktionen abnahmen, während die Bildung von IQGAP1- β -Catenin-Komplexen zunahm. Die Dissoziation von α -Catenin erfolgte vor der Dissoziation von E-Cadherin und β -Catenin von den Zell-Zell-Adhäsionsstellen (Fukata *et al.*, 2001; Tsukatani *et al.*, 1997), d.h. während α -Catenin bereits im Zytoplasma detektiert werden konnte, waren E-Cadherin und β -Catenin noch in den Kontaktstellen lokalisiert (Fukata *et al.*, 2001). Aktiviertes Rac1 reguliert somit negativ die IQGAP1 Funktion, d.h. die Interaktion von IQGAP1 mit β -Catenin wird durch die aktivierte GTPase inhibiert. Dies führt zu einer Stabilisierung des Cadherin/Catenin Komplexes (Fukata *et al.*, 1999; Fukata *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 1998).

Dies führt zu der Hypothese, dass in Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimieren, weniger GTP-Rac vorliegt und somit die Interaktion von IQGAP1- β -Catenin nicht blockiert wird. Dies resultiert wiederum in der Destabilisierung der E-Cadherin/Catenin Komplexe und einer reduzierten Zell-Zell-Adhäsion.

10. Räumliche und zeitliche E-Cadherin-Verteilung während der Zellbewegung

Zur Aufklärung der funktionellen Bedeutung von mutiertem E-Cadherin für die Motilität von MDA-MB-435S Zellen wurde die Lokalisation des Zelladhäsionsmoleküls während der Migration analysiert. Im Rahmen vorliegender Arbeit wurden deshalb E-Cadherin-EGFP (EcadEGFP) Expressionskonstrukte hergestellt, welche das *wt*- bzw. das E-Cadherin-Gen mit der Punktmutation in Exon 8 trugen. Humane MDA-MB-435S Tumorzellen wurden mit den Konstrukten, sowie dem Expressionsvektor pEGFP-N2 alleine stabil transfiziert. Eine ausführliche Charakterisierung der erhaltenen Klone auf DNA- und Proteinebene wies die Richtigkeit der Fusionsproteine nach. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass das C-terminal klonierte EGFP keinen Einfluss auf die β -Catenin Lokalisation hat. Nach Etablierung der Zelllinien wurden sie für Experimente in der Inkubationskammer eingesetzt. Als Grundlage für die Versuche dienten die Ergebnisse der Experimente mit MDA-MB-435S Zellen, die unmarkiertes *wt*- bzw. *del8*-E-Cadherin exprimierten. Durch den Einsatz EcadEGFP transfizierter Zellen war es erstmals möglich, die Lokalisation von mutiertem E-Cadherin während der Zellbewegung in Abhängigkeit des spezifischen EGF-Rezeptor Inhibitors Tyrphostin AG1478 und des Wachstumsfaktors EGF zu untersuchen. Zusätzlich bestätigten diese Experimente das Motilitätsverhalten der Zellen, die mit unmarkiertem E-Cadherin transfiziert worden waren, in Abhängigkeit von Tyrphostin AG1478 und EGF, was zeigt, dass EGFP die E-Cadherin-Funktion nicht beeinträchtigt.

In unbehandelten, mit *wt*-EcadEGFP transfizierten MDA-MB-435S Zellen war *wt*-EcadEGFP an den Zell-Zell-Kontakten, nicht aber an den Zellrändern lokalisiert. Reissverschlussartige E-Cadherin-Ansammlungen waren teilweise an den Zell-Zell-Adhäsionen erkennbar. In diesen Experimenten konnten die von Adams *et al.* (1998) beschriebenen drei Phasen der Entstehung von Zell-Zell-Adhäsion (Abb. 65 und

QuickTime Movie) bestätigt werden. Dies bedeutet, dass dieses Modell für die Auswertung der Versuche mit mutiertem E-Cadherin verwendet werden kann.

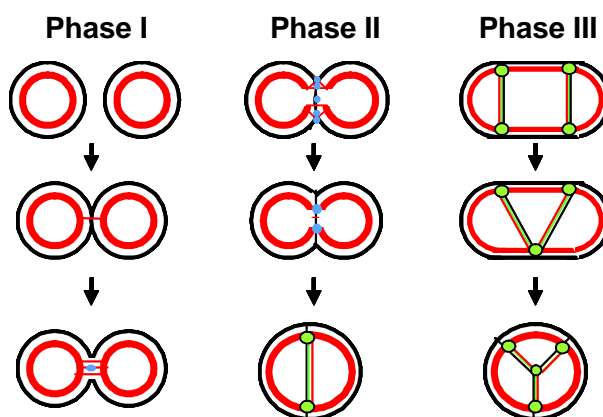


Abb. 65: Drei-Phasen-Modell für die Zell-Zell-Adhäsion und Koloniebildung

Dicke rote Linie: periphere Aktinfasern; dünne rote Linie: Aktinfasern innerhalb der Zellen; blaue Kreise: E-Cadherin-Cluster; grüne Kreise: E-Cadherin-Plaques; grüne Linie: diffuse E-Cadherin-Verteilung (modifiziert nach Adams *et al.*, 1998).

Adams und Kollegen zeigten in epithelialen MDCK-Zellen mittels *wt*-E-Cadherin, welches C-terminal GFP-markiert worden war, dass sowohl E-Cadherin, als auch Aktin in die Zell-Zell-Adhäsion involviert sind. In Phase I induziert ein neuer Membrankontakt zweier Zellen die Akkumulation eines hoch mobilen, diffusen Pools von Zelloberflächen-E-Cadherin-Molekülen in einem immobilen Punkt am Zellkontakt. Diese E-Cadherin-Ansammlung korreliert räumlich mit der Membrananhaftungsstelle der Aktinfilamente, welche von den peripheren, jede Zelle begrenzenden Aktinfasern abzweigen. In Phase II lösen sich die nahe des Zellkontaktes lokalisierten peripheren Aktinfasern, wodurch zwei Enden entstehen, die sich nach außen zum Rand der Kontaktstelle hin bewegen. Ein Teil des akkumulierten E-Cadherins wandert ebenfalls zu den Kontakträndern und wächst dort zu großen E-Cadherin-Plaques zusammen. Daraus resultierend kommt es zur Ausbildung eines Aktinringes, der beide Zellen begrenzt. In diesem Stadium, das auch als Verdichtung bezeichnet wird, ist die Zell-Zell-Adhäsivität am stärksten. Adhärenzen weitere einzelne Zellen an den Klon, wird der Ablauf der E-Cadherin- und Aktin-Verteilung wiederholt. Wenn Zellen an Klone mit einer Größe von mehr als drei Zellen adhären, kommt es zur Phase III der Zell-Zell-Adhäsion. Dabei ziehen sich die peripheren, mit E-Cadherin-Plaques an den Zell-Zell-Kontakten verbundenen

Aktinfasern zusammen, wodurch ein weiteres Zusammenwachsen von einzelnen Plaques in den Eckpunkten vielzelliger Kontakte induziert wird. Die Reorganisation von E-Cadherin und Aktin resultiert schließlich in der Verdichtung von Zellen zu größeren Kolonien.

Der EGF-Rezeptor Inhibitor Tyrphostin AG1478 hatte keine Auswirkungen auf die E-Cadherin-Lokalisation in *wt*-EcadEGFP exprimierenden MDA-MB-435S Zellen. Im Gegensatz dazu induzierte die Zugabe von EGF eine deutliche Änderung der E-Cadherin-Verteilung. In den kurzzeitig ausgebildeten Zell-Zell-Kontakten kam es nur zur Phase I, d.h. die E-Cadherin-Moleküle akkumulierten zwar am Zellkontakt, bewegten sich aber nicht an die Randstellen des Kontaktes und wuchsen zu keinen E-Cadherin-Plaques zusammen. Befanden sich die Zellen vor der EGF-Zugabe in Phase II, so führte der Inhibitor verstärkt zu einem Wechsel zurück in die Phase I und schließlich zum Verlust des Zellkontaktes. E-Cadherin-Moleküle konnten über die gesamte Zelloberfläche unabhängig von Zell-Zell-Adhäsionen und im Zytoplasma detektiert werden. Auffallend war die verstärkte EcadEGFP-Lokalisation in den Lamellipodien.

lino und Kollegen (lino *et al.*, 2001) postulierten, dass der Hauptteil der *wt*-E-Cadherin-Moleküle an der Zelloberfläche als Oligomere verschiedener Größe, d.h. Dimere bis maximal Decamere, vorliegen. In Experimenten mit C-terminal GFP-markiertem *wt*-E-Cadherin zeigte diese Arbeitsgruppe, dass die Oligomerbildung an der Zelloberfläche vor der Ansammlung an den Zell-Zell-Adhäsionsstellen erfolgt. Die gebildeten Oligomere dienen als Sensoren für neue physikalische Kontakte mit anderen Zellen und sind sowohl für die Initiation der hoch affinen Zell-Zell-Adhäsion, als auch für die Ausbildung von Adhäsionsstrukturen wichtig. Weiterhin wiesen lino und Kollegen nach, dass die E-Cadherin-Bewegung auf der Zelloberfläche durch die Interaktion mit dem Zytoskelett reguliert wird (lino *et al.*, 2001). In der von Adams *et al.* (1998) beschriebenen Phase II der Zellkontaktbildung bewegt sich ein Teil der akkumulierten E-Cadherin-Moleküle zu den Rändern des Kontaktes und wächst zu großen E-Cadherin-Plaques zusammen. Weiteres E-Cadherin lagert sich zwischen den Plaques an der Kontaktstelle an. Diese Beobachtungen bestätigen die Notwendigkeit der Oligomerisierung von E-Cadherin-Molekülen für die Adhäsion (lino *et al.*, 2001). In *wt*-EcadEGFP exprimierenden MDA-MB-435S Zellen konnten im unbehandelten Zustand, d.h. in Vollmedium, viele stark fluoreszierende EcadEGFP-Molekül-Ansammlungen am Zellrand und im Zytoplasma detektiert werden. Dies führt

zu der Hypothese, dass es sich dabei um die von Iino *et al.* (2001) beschriebene Oligomerisierung handelt. Allerdings erfolgten die Aufnahmen der Zellen in der Inkubationskammer im Abstand von 2-3 min, weshalb keine sicheren Aussagen über eine Oligomerbewegung getroffen werden konnten.

MDA-MB-435S Zellen, die mit *p8*-EcadEGFP transfiziert worden waren, unterschieden sich deutlich in der E-Cadherin-Verteilung von *wt*-EcadEGFP exprimierenden Zellen. Mutiertes, EGFP-markiertes E-Cadherin war am gesamten Zellrand und vor allem in den Lamellipodien lokalisiert, wobei sich die Fluoreszenzintensität ständig abrupt änderte. Die Zell-Zell-Kontakte befanden sich meist nur in Phase I und wurden sehr schnell wieder gelöst. Die Phase II war nicht so deutlich ausgeprägt wie in *wt*-EcadEGFP exprimierenden Zellen, d.h. nur wenige, kleine E-Cadherin-Plaques waren erkennbar. Die Bewegungsaktivität des mutierten EcadEGFP war am Zellrand, den Zell-Zell-Adhäsionsstellen und im Zytoplasma äußerst hoch. Weiterhin wurden in *p8*-EcadEGFP exprimierenden Zellen stärker fluoreszierende EcadEGFP-Ansammlungen beobachtet, was zu der Hypothese führt, dass in diesen Zellen Oligomere mit einer größeren Anzahl an E-Cadherin-Molekülen im Vergleich zu *wt*-EcadEGFP exprimierenden Zellen gebildet werden. Tyrphostin AG1478 induzierte in Zellen, die mit *p8*-EcadEGFP transfiziert worden waren, eine stärkeren Ausprägung der Phase II. E-Cadherin-Plaques waren vermehrt erkennbar. Die erhöhte Fluoreszenzintensität an den Kontaktstellen weist auf eine verstärkte Zell-Zell-Adhäsivität hin. Die Lokalisation von *p8*-EcadEGFP war nach Tyrphostin AG1478 Zugabe am Zellrand reduziert und im Zytoplasma und perinukleär erhöht. Neue Zell-Zell-Kontakte wurden seltener wieder gelöst. Der Wachstumsfaktor EGF zeigte keine deutlichen Auswirkungen auf die Lokalisation von *p8*-EcadEGFP, d.h. die E-Cadherin-Moleküle waren wie in unbehandelten MDA-MB-435S Zellen, die mit *p8*-EcadEGFP transfiziert worden waren, lokalisiert.

Weiterführende Versuche in der Inkubationskammer mit Aufnahmen in kürzeren Zeitabständen werden genauere Einblicke in die Oligomerisierung der E-Cadherin-Moleküle und die Abläufe der Phasenbildung in Abhängigkeit von mutiertem E-Cadherin geben. Die in dieser Arbeit etablierten EcadEGFP Klone dienen als Grundlage für weitere Studien.

11. Ausblick

Vorliegende Arbeit hat dazu beigetragen, einen Einblick in die durch mutiertes E-Cadherin veränderte Signaltransduktion, die Lokalisation wichtiger Proteine (E-Cadherin, Rac1) und die daraus resultierenden zellulären Veränderungen zu geben. Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten E-Cadherin Mutationen nicht nur die adhäsiven Eigenschaften, sondern auch das Migrations- und Proliferationsverhalten von MDA-MB-435S Zellen beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass die durch mutiertes E-Cadherin erhöhte Zellmotilität durch Inhibitoren des EGF-Rezeptor- und PI3-Kinase-Signalweges blockiert werden kann. Dadurch konnten neue, therapeutisch interessante Zielmoleküle identifiziert werden. Die Inhibition des EGF-Rezeptor- und PI3-Kinase-Signalweges, sowie der MMP3 mit *small molecule drugs* ist ein viel versprechender Ansatz in der Behandlung von malignen Tumoren mit E-Cadherin Mutationen.

F LITERATURVERZEICHNIS

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997). Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**: 3797-3804.
- Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW (1991). Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature.* **353**: 668-670.
- Adams CL, Chen YT, Smith SJ, Nelson WJ (1998). Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J Cell Biol.* **142**: 1105-1119.
- Adelsman MA, McCarthy JB, Shimizu Y (1999). Stimulation of beta1-integrin function by epidermal growth factor and heregulin-beta has distinct requirements for erbB2 but a similar dependence on phosphoinositide 3-OH kinase. *Mol Biol Cell* **10**: 2861-2878.
- Aicher B, Lerch MM, Muller T, Schilling J, Ullrich A (1997). Cellular redistribution of protein tyrosine phosphatases LAR and PTPsigma by inducible proteolytic processing. *J Cell Biol.* **138**: 681-696.
- Aird I and Bentall H (1953). A relationship between cancer of stomach and ABO groups. *BMJ* **1**: 799
- Akhtar N, Hudson KR, Hotchin NA (2000). Co-localization of Rac1 and E-cadherin in human epidermal keratinocytes. *Cell Adhes Commun.* **7**: 465-476.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* **270**: 27489-27494.
- Akiyama SK (1996). Integrins in cell adhesion and signaling. *Hum Cell.* **9**: 181-186.
- Aspenström P (1999). The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res.* **246**: 20-25.
- Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, Maines-Bandiera S, Somasiri A, Roskelley CD (1999). E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6249-6254.
- Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA (1993). Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* **71**: 1368-1383.
- Banfíc H, Tang X, Batty IH, Downes CP, Chen C, Rittenhouse SE (1998). A novel integrin-activated pathway forms PKB/Akt-stimulatory phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate via phosphatidylinositol 3-phosphate in platelets. *J Biol Chem.* **273**: 13-16.

- Bao J, Alroy I, Waterman H, Schejter ED, Brodie C, Gruenberg J, Yarden Y (2000). Threonine phosphorylation diverts internalized epidermal growth factor receptors from a degradative pathway to the recycling endosome. *J Biol Chem.* **275**: 26178-26186.
- Baumann P and West SC (1998). DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14066-14070.
- Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ (1997). Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* **9**: 683-90. Review.
- Basbaum CB and Werb Z (1996). Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Opin Cell Biol.* **8**: 731-738.
- Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herrerros A (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* **2**: 84-89.
- Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G (1996). All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem.* **271**: 5251-5257.
- Bishayee S (2000). Role of conformational alteration in the epidermal growth factor receptor (EGFR) function. *Biochem Pharmacol.* **60**: 1217-23. Review.
- Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Huang HH, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H (1993). Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas. *Hum Mol Genet.* **2**: 803-804.
- Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H (1994). E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* **54**: 3845-3852.
- Beckmann MW, Niederacher D, Massenkeil G, Tutschek B, Beckmann A, Schenko G, Schnurch HG, Bender HG (1996). Expression analyses of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu: no advantage of prediction of recurrence or survival in breast cancer patients. *Oncology.* **53**: 441-7.
- Behrens J, Lowrick O, Klein-Hitpass L, Birchmeier W (1991). The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 11495-11499.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**: 638-642.
- Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**: 596-599.

- Benard V, Bohl BP, Bokoch GM (1999). Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J Biol Chem.* **274**; 13198-13204.
- Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F (1995). E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J.* **14**: 6107-1615.
- Berx G, Becker KF, Höfler H, van Roy F (1998). Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat.*, **12**: 226-237.
- 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.
- Birnboim HC und Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-23.
- Birnboim HC (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**: 243-55.
- Boguski MS, McCormick F (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, **366**: 643-654.
- Bouck N, Stellmach V, Hsu SC (1996). How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res*, **69**:135-174.
- Boyer B, Valles AM, Edme N (2000). Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol.* **60**: 1091-9. Review.
- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T (1999). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol.* **155**: 1033-1038.
- Braga VM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA (1997). The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol.* **137**: 1421-1431.
- Braga VM, Del Maschio A, Machesky L, Dejana E (1999). Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell.* **10**: 9-22.
- Burgering BM and Coffey PJ (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* **376**: 599-602.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F and Nieto MA (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* **2**: 76-83.

- Cantley LC (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**: 1655-1657.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**: 147-157.
- Cats A, Meuwissen SGM, Forman D, Craanen E, Kuipers EJ (1998). Helicobacter pylori: a true carcinogen. *Europ J Gastro Hepatol.* **10**: 447-550.
- Coffer PJ, Geijssen N, M'rabet L, Schweizer RC, Maikoe T, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L (1998). Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function. *Biochem J.* **329**: 121-130.
- Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell.* **7**; 1267-1278.
- Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**: 1137-1146.
- Coussens LM and Werb Z (1996). Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Bio* **3**: 895-904.
- Crawford HC and Matrisian LM (1994). Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis.* **14**:234-245. Review.
- Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**: 478-480.
- Cunningham BA, Leutzinger Y, Gallin WJ, Sorkin BC, Edelman GM (1984). Linear organization of the liver cell adhesion molecule L-CAM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**: 5787-5791.
- Damsky CH, Richa J, Solter D, Knudsen K, Buck CA (1983). Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* **34**: 455-466.
- Datta K, Franke TF, Chan TO, Makris A, Yang SI, Kaplan DR, Morrison DK, Golemis EA, Tsichlis PN (1995). AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation. *Mol Cell Biol* **15**: 2304-2310.

- Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**: 557-560.
- Davenport D, Nichol JAC (1955). Luminescence in Hydromedusae. *Proceedings of the Royal Society, Series B* **144**: 399-411.
- Davies G, Jiang WG, Mason MD (2001). Matrilysin mediates extracellular cleavage of E-cadherin from prostate cancer cells: a key mechanism in hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell-cell dissociation and in vitro invasion. *Clin Cancer Res.* **7**: 3289-3297.
- DeClerck YA, Perez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE, Taylor SM (1992). Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res*, **52**: 701-708.
- Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997). Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J Biol Chem* **272**: 19125-19132.
- Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**: 682-685.
- Dewhirst MW, Klitzman B, Braun RD, Brizel DM, Haroon ZA, Secomb TW (2000). Review of methods used to study oxygen transport at the microcirculatory level. *Int J Cancer* **90**: 237-255. Review.
- Doherty P and Walsh FS (1996). CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol. Cell Neurosci.*, **8**: 99-111.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ and Saltiel AR (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 7686-7689.
- Ellison G, Klinowska T, Westwood RF, Docter E, French T, Fox JC (2002). Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol Pathol.* **55** :294-299.
- Evers EE, van der Kammen RA, ten Klooster JP, Collard JG (2000). Rho-like GTPases in tumor cell invasion. *Methods Enzymol.* **325**: 403-415.
- Fagotto F, Gluck U, Gumbiner BM (1998). Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol.* **8**: 181-190.
- Folkman J (1997). Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS.*, **79**: 1-8.
- Folkman, J (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* **1**: 27-31.

- Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81**: 727-736.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**: 665-668.
- Frixen UH, 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**: 173-185.
- Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* **67**: 481-507.
- 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 KF, 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**: 129-141.
- Fukata M, Kuroda S, Nakagawa M, Kawajiri A, Itoh N, Shoji I, Matsuura Y, Yonehara S, Fujisawa H, Kikuchi A, Kaibuchi K (1999). Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem.* **274**: 26044-26050.
- Fukata M and Kaibuchi K (2001). Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 887-897. Review.
- Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S (1998). Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res.* **58**: 3526-3528.
- Gallin WJ, Edelman GM, Cunningham BA (1983). Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **80**: 1038-1042.
- Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, Machado JC, Pinto E, Seruca R, Halling K, MacLeod P, Powell SM, Jackson CE, Ponder BA, Caldas C (1998). Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res.* **58**: 4086-4089.
- Geiger B and Ayalon O (1992). Cadherins. *Annu Rev Cell Biol,* **8**: 307-332.
- Go MF (2002). Review article: natural history and epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Aliment Pharmacol Ther.* **16 Suppl 1**: 3-15. Review.
- Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH (1994). Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst.* **86**: 1600-1608.

- Gomez N and Cohen P (1991). Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* **353**: 170-173.
- Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, and Baylin SB (1995). E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.* **55**: 5195-5199.
- Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ (1996). Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **78**: 1284-92.
- Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, Markowitz SD, Willis J, Lynch H, Rajput A, Wiesner GL, Lindor NM, Burgart LJ, Toro TT, Lee D, Limacher JM, Shaw DW, Findlay MP, Reeve AE (1999). E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat.* **14**: 249-255.
- Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. **267**: 389-393.
- Haenszel W, Kurihara M, Locke FB, Shimuzu K, Segi M (1976). Stomach cancer in Japan. *J Natl Cancer Inst.* **56**: 265-274.
- Hahnfeldt P, Panigrahy D, Folkman J, Hlatky L (1999). Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Res*, **59**: 4770-4775.
- Hall A (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514. Review.
- Hanahan D and Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364.
- Handschuh G, Candidus S, Lubert B, Reich U, Schott C, Oswald S, Becke H, Hutzler P, Birchmeier W, Höfler H, and Becker K-F (1999). Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* **18**: 4301-4312.
- Handschuh G, Lubert B, Hutzler P, Höfler 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**: 455-464.
- Handschuh G, Lubert B, Hutzler P, Hofler H, Becker KF (2002). Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences. *J Mol Biol.* **314**: 445-454.
- Hartmann-Petersen R, Walmod PS, Berezin A, Berezin V, Bock E (2000). Individual cell motility studied by time-lapse video recording: influence of experimental conditions. *Cytometry.* **40**: 260-270.

- Hatta K, Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M (1988). Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol.* **106**: 873-881.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol,* **148**: 779-790.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**: 1509-1512.
- Heim R, Prasher DC, Tsien RY (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 12501-12504.
- Hennig G, Behrens J, Truss M, Frisch S, Reichmann E, Birchmeier W (1995). Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo. *Oncogene* **11**: 475-484.
- Herbst RS und Langer CJ (2002). Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Semin Oncol* **29**: 27-36.
- Hiraguri S, Godfrey T, Nakamura H, Graff J, Collins C, Shayesteh L, Doggett N, Johnson K, Wheelock M, Herman J, Baylin S, Pinkel D, Gray J (1998). Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines. *Cancer Res*, **58**: 1972-1977.
- Hirohashi S. (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am. J. Pathol.* **153**: 333-339.
- Holly SP, Larson MK, Parise LV (2000). Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res.* **261**: 69-74. Review.
- Hordijk PL, ten Klooster JP, van der Kammen RA, Michiels F, Oomen LC, Collard JG (1997). Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. **278**: 1464-1466.
- Hoschuetzky H, Aberle H, and Kemler R (1994). Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* **127**: 1375-1380.
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev.* **59**: 3-10.
- Hülsken J, Birchmeier W, Behrens J (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol.* **127**: 2061-2069.

- Iino R, Koyama I, Kusumi A (2001). Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophys J*. **80**: 2667-2677.
- Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J*. **17**: 1371-1384.
- Imamura Y, Itoh M, Maeno Y, Tsukita S, Nagafuchi A (1999). Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biol*. **144**:1311-1322.
- Imhof BA, Vollmers HP, Goodman SL, Birchmeier W (1983). Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* **35**: 667-675.
- Ito K, Okamoto I, Araki N, Kawano Y, Nakao M, Fujiyama S, Tomita K, Mimori T, Saya H (1999). Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. *Oncogene* **18**: 7080-7090.
- Jawhari AU, Noda M, Farthing MJ, Pignatelli M (1999). Abnormal expression and function of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma cell lines. *Br J Cancer* **80**: 322-330.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, **6**: 3901-3907.
- Jiang WG and Mansel RE (2000). E-cadherin complex and its abnormalities in human breast cancer. *Surg Oncol*. **9**: 151-171.
- Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T, Liu YC (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**: 309-312.
- Jones EG (1964). Familial gastric cancer. *N Z Med J* **63**: 287-290.
- Jou TS and Nelson WJ (1998). Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. *J Cell Biol*. **142**: 85-100.
- Kanai Y, Oda T, Tsuda H, Ochiai A, Hirohashi S (1994). Point mutation of the E-cadherin gene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Jpn J Cancer Res*. **85**: 1035-1039.
- Kanai Y, Ushijima S, Hui AM, Ochiai A, Tsuda H, Sakamoto M, Hirohashi S (1997). The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* **71**: 355-359.

- Kandel ES and Hay N (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res.* **253**: 210-229.
- Kapeller R, Chakrabarti R, Cantley L, Fay F, Corvera S (1993). Internalization of activated platelet-derived growth factor receptor-phosphatidylinositol-3' kinase complexes: potential interactions with the microtubule cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* **13**: 6052-6063.
- Keller G, Vogelsang H, Becker I, Hutter J, Ott K, Candidus S, Grundei T, Becker KF, Mueller J, Siewert JR, 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**: 337-342.
- Khosravi-Far R, Campbell S, Rossman KL, Der CJ (1998). Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv Cancer Res.* **72**: 57-107.
- Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J (1997). Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.* **16**: 2783-2793.
- Kim, JB, Islam S, Kim YJ, Prudoff RS, Sass KM, Wheelock MJ, and Johnson KR (2000). N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility. *J Cell Biol.* **151**: 1193-1206.
- King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tsichlis PN, Brugge JS (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol.* **17**: 4406-4418.
- Kinzler KW and Vogelstein B (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**:159-170. Review.
- Klemke, RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, and Cheresh DA (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* **137**: 481-492.
- Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA (1992). The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev.* **13**: 3-17. Review.
- Kloss CUA (2000). Integrine und Neuroglia - Eine Familie von Zelladhäsionsmolekülen und die Mikroglia-Aktivierung im zentralen Nervensystem. Dissertation am MPI für Neurobiologie, Abteilung Neuromorphologie, Martinsried, Germany.
- Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM (1991). Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac2. *Science* **254**: 1512-1515.

- Knaus UG, Wang Y, Reilly AM, Warnock D, Jackson JH (1998). Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J Biol Chem.* **273**: 21512-21518.
- Knudson AG Jr (1979). Mutagenesis and embryonal carcinogenesis. *Natl Cancer Institut Monogr.* **51**: 19-24
- Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol.* **130**: 67-77.
- Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y, Asakura H (2000). Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* **82**: 1689-1693.
- Kornilova E, Sorkina T, Beguinot L, Sorkin A (1996). Lysosomal targeting of epidermal growth factor receptors via a kinase-dependent pathway is mediated by the receptor carboxyl-terminal residues 1022-1123. *J Biol Chem.* **271**: 30340-30346.
- Kozlova NI, Morozevich GE, Chubukina AN, Berman AE (2001). Integrin alpha v beta 3 promotes anchorage-dependent apoptosis in human intestinal carcinoma cells. *Oncogene* **20**: 4710-4717.
- Krasilnikov MA (2000). Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc)* **65**: 59-67.
- Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M, Fujii K, Nakamura T, Ookubo T, Izawa I, Nagase T, Nomura N, Tani H, Shoji I, Matsuura Y, Yonehara S, Kaibuchi K (1998). Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* **281**: 832-835.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lauffenburger DA and Horwitz AF (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**: 359-369.
- La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A (1992). Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* **70**: 50-55.
- Le TL, Yap AS, Stow JL (1999). Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol.* **146**: 219-232.
- Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell.* **4**: 1029-1040.

- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* **74**: 49-139. Review.
- Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol.* **139**: 1861-1872.
- Lowes VL, Ip NY, Wong YH (2002). Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors. *Neurosignals.* **11**: 5-19.
- Luber B, Candidus S, Handschuh G, Mentele E, Hutzler P, Feller S, Voss J, Hofler H, Becker KF (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.
- Luttrell BM (1994). Cellular actions of inositol phosphates and other natural calcium and magnesium chelators. *Cell Signal.* **6**: 355-362.
- Maehama T and Dixon JE (1999). PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* **9**: 125-128.
- Magun R, Burgering BM, Coffey PJ, Pardasani D, Lin Y, Chabot J, Sorisky A (1996). Expression of a constitutively activated form of protein kinase B (c-Akt) in 3T3-L1 preadipose cells causes spontaneous differentiation. *Endocrinology* **137**: 3590-3593.
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bell D, Bianchi Porro G, Deltenre M, Forman D, Gasbarrini G, Jaup B, Misiewicz JJ, Pajares J, Quina M, Rauws E (1997). Current European concepts in the management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht Consensus Report. The European Helicobacter Pylori Study Group (EHPSG). *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **9**: 1-2. Review.
- Marks PW, Hendey B, Maxfield FR (1991). Attachment to fibronectin or vitronectin makes human neutrophil migration sensitive to alterations in cytosolic free calcium concentration. *J Cell Biol.* **112**: 149-158.
- Martelli AM, Capitani S, Neri LM (1999). The generation of lipid signaling molecules in the nucleus. *Prog Lipid Res.* **38**: 273-308. Review.
- Matozaki T, Nakanishi H, Takai Y (2000). Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal.* **12**: 515-524.
- Meiners S, Brinkmann V, Naundorf H, Birchmeier W (1998). Role of morphogenetic factors in metastasis of mammary carcinoma cells. *Oncogene* **16**: 9-20.
- Menke A, Philippi C, Vogelmann R, Seidel B, Lutz MP, Adler G, Wedlich D (2001). Down-regulation of E-cadherin gene expression by collagen type I and type III in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res.* **61**: 3508-35017.

- Messa C, Russo F, Caruso MG, Di Leo A (1998). EGF, TGF- α , and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol.* **37**: 285-9.
- Mitic LL and Anderson JM (1998). Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol.* **60**: 121-142.
- Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol.* **135**: 1633-1642.
- Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**: 391-399.
- Morin, J.G., and Hastings, J.W. (1971) Energy Transfer in a Bioluminescent System. *J. Cell Physiol.* **77**:313-317.
- Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry.* **13**: 2656-2662.
- Müller T, Choidas A, Reichmann E, Ullrich A (1999). Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J Biol Chem.* **274**: 10173-10183.
- Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE (1998). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut* **43**: 791-797
- Muta H, Noguchi M, Kanai Y, Ochiai A, Nawata H, Hirohashi S (1996). E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Jpn J Cancer Res.* **87**: 843-848.
- Naito Y and Yoshikawa T (2002). Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress(1,2). *Free Radic Biol Med.* **33**:323-336.
- Nakagawa M, Fukata M, Yamaga M, Itoh N, Kaibuchi K (2001). Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci.* **114**: 1829-1838.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol.* **147**: 631-644.
- Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci.* **114**: 111-118.

- Nollet F, Berx G, van Roy F (1999). The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun.* **2**: 77-85. Review.
- Nollet F, Kools P, van Roy F (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol.* **299**: 551-572.
- Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW (1997). Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem.* **272**: 24735-24738.
- Osherov N and Levitzki A (1994). Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem.* **225**: 1047-1053.
- Ozawa M, Ringwald M, Kemler R (1990). Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**: 4246-4250.
- Palacios J and Gamallo C (1998). Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res.* **58**: 1344-1347.
- Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* **385**: 537-540.
- Parise LV, Lee J, Juliano RL (2000). New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin Cancer Biol.* **10**: 407-414.
- Parsonnet J (1996). Helicobacter pylori in the stomach--a paradox unmasked. *N Engl J Med.* **335**: 278-280.
- Pece S and Gutkind JS (2000). Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem.* **275**: 41227-41233.
- Pece S, Chiariello M, Murga C, Gutkind JS (1999). Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem.* **274**: 19347-19351.
- Peifer M, Berg S, Reynolds AB (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* **76**: 789-791.
- Peluso JJ (2000). N-cadherin-mediated cell contact regulates ovarian surface epithelial cell survival. *Biol Signals Recept.* **9**: 115-121.
- Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* **392**: 190-193.

- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J.* **18**: 1738-1747.
- Phadnis SH, Parlow MH, Levy M, Ilver D, Caulkins CM, Connors JB, Dunn BE (1996). Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect Immun.* **64**: 905-912.
- Potempa S and Ridley AJ (1998). Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell.* **9**: 2185-2200.
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2001). The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr. Relat. Cancer* **8**: 11-31.
- Rhyu MG, Park WS, Jung YJ, Choi SW, Meltzer SJ (1994). Allelic deletions of MCC/APC and p53 are frequent late events in human gastric carcinogenesis. *Gastroenterology* **106**: 1584-1588.
- Richards FM, McKee SA, Rajpar MH, Cole TR, Evans DG, Jankowski JA, McKeown C, Sanders DS, Maher ER (1999). Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genet.* **8**: 607-610.
- Ridley AJ and Hall A (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**: 389-399.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**: 401-410.
- Riese J, Yu X, Munneryn A, Eresh S, Hsu SC, Grosschedl R, Bienz M (1997). LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell* **88**: 777-787.
- Rimm DL, Sinard JH, Morrow JS (1995). Reduced alpha-catenin and E-cadherin expression in breast cancer. *Lab Invest.* **72**: 506-512.
- Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J (1994). Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet.* **7**: 98-102.
- Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage, © Urban & Fischer Verlag, München 1999
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**: 527-532.

- Rodriguez-Viciano P, Marte BM, Warne PH, Downward J (1996). Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **351**: 225-231; discussion 231-2. Review.
- Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* **24**(3):227-235.
- Ross RS and Borg TK (2001). Integrins and the myocardium. *Circ Res.* **88**: 1112-1119. Review.
- Roymans D and Siegers H (2001). Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem.* **268**: 487-498.
- Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P (1995). The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem.* **270**: 5549-5555.
- Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science.* **275**: 1790-1792.
- Ruoslahti E (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **12**:697-715. Review.
- Salomon DS, Normanno N, Ciardiello F, Brandt R, Shoyab M, Todaro GJ (1995). The role of amphiregulin in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **33**: 103-14. Review.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York, **2**: 155-166
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-7.
- Sander EE and Collard JG (1999). Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* **35**: 1905-1911. Review.
- Sano T, Tsujino T, Yoshida K, Nakayama H, Haruma K, Ito H, Nakamura Y, Kajiyama G, Tahara E (1991). Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Res.* **51**: 2926-2931.
- Sasaki CY, Lin H, Morin PJ, Longo DL (2000). Truncation of the extracellular region abrogates cell contact but retains the growth-suppressive activity of E-cadherin. *Cancer Res* **60**: 7057-7065
- Schneller M, Vuori K, Ruoslahti E (1997). Alpha5beta3 integrin associates with activated insulin and PDGFBeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J.* **16**: 5600-5607.

- Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, Harbeck N, Schmitt M, Lengyel E (2000). Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* **19**: 3013-3020.
- Schnelzer AC (2001). Untersuchungen zum kleinen G-Protein Rac1 beim Mammakarzinom. Frauenklinik und Poliklinik der TUM, Klinikum rechts der Isar, München, Germany.
- Schuh D, Herrmann WR, Kunze KD, Zotter S (1986). [The importance of autopsy for quality assurance in medical care] *Zentralbl Allg Pathol.* **132**: 253-265.
- Seidensticker MJ and Behrens J (2000). Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim Biophys Acta.* **1495**: 168-182. Review.
- Shibasaki F, Fukami K, Fukui Y, Takenawa T (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase binds to alpha-actinin through the p85 subunit. *Biochem J.* **302**: 551-557.
- Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M (1996). E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* **77**: 1605-1613. Review.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 5522-5527.
- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* **2**: 249-256.
- Soltoff SP, Carraway KL 3rd, Prigent SA, Gullick WG, Cantley LC (1994). ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* **14**: 3550-3558.
- Stein M, Rappuoli R, Covacci A (2001). The *cag* pathogenicity island. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, eds. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington, DC: ASM Press, 345-53.
- Strohmeyer D (1999). Pathophysiology of tumor angiogenesis and its relevance in renal cell cancer. *Anticancer Res.* **19**:1557-1561. Review.
- Tahara E, Semba S, Tahara H (1996). Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol.* **23**: 307-315. Review.
- Takahashi K, Suzuki K, Tsukatani Y (1997). Induction of tyrosine phosphorylation and association of beta-catenin with EGF receptor upon tryptic digestion of quiescent cells at confluence. *Oncogene* **15**: 71-78.
- Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y (1997). Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol.* **139**: 1047-1059.

- Takeichi M (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem.* **59**:237-52. Review.
- Tamura G, Sakata K, Nishizuka S, Maesawa C, Suzuki Y, Iwaya T, Terashima M, Saito K, Satodate R (1996). Inactivation of the E-cadherin gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res.* **87**: 1153-1159.
- Tetsu O and McCormick F (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**: 422-426.
- Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavitgian SV, Tulinius H, Ogmundsdottir HM, Eyfjord JE (1996). A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet.* **13**: 117-119.
- Tsuchiya Y, Sato H, Endo Y, Okada Y, Mai M, Sasaki T, Seiki M (1993). Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is a negative regulator of the metastatic ability of a human gastric cancer cell line, KKLS, in the chick embryo. *Cancer Res.* **53**: 1397-1402.
- Tsukatani Y, Suzuki K, Takahashi K (1997). Loss of density-dependent growth inhibition and dissociation of alpha-catenin from E-cadherin. *J Cell Physiol.* **173**: 54-63.
- Ullrich A and Schlessinger J (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212.
- Van Aelst L and D'Souza-Schorey C (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**: 2295-2322.
- Van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell* **88**: 789-799.
- Van de Wetering M, Barker N, Harkes IC, van der Heyden M, Dijk NJ, Hollestelle A, Klijjn JG, Clevers H, Schutte M (2001). Mutant E-cadherin breast cancer cells do not display constitutive Wnt signaling. *Cancer Res.* **61**: 278-284.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci.* **22**: 267-272.
- Vanhaesebroeck B and Alessi DR (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* **346**: 561-576.
- Varley JM, McGown G, Thorncroft M, Tricker KJ, Teare MD, Santibanez-Koref MF, Martin J, Birch JM, Evans DG (1995). An extended Li-Fraumeni kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53. *J Med Genet.* **32**: 942-945.

- Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* **66**: 107-119.
- Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS (1997). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol.* **8**: 1197-1206. Review.
- Von der Mark K and Goodman S (1993). Adhesive glycoproteins , connective tissue and its heritable disorders. *Anonymous Wiley-Liss, Inc.* 211-236.
- Walker RA and Dearing SJ (1999). Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* **53**: 167-76.
- Warren JR and Marshall B (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1273-1275
- Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Yarden Y (1999). The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* **274**: 22151-22154.
- Woodfield RJ, Hodgkin MN, Akhtar N, Morse MA, Fuller KJ, Saqib K, Thompson NT, Wakelam MJ (2001). The p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase is associated with beta-catenin in the cadherin-based adhesion complex. *Biochem J.* **360**: 335-344.
- Xu L, Corcoran RB, Welsh JW, Pennica D, Levine AJ (2000). WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev.* **14**: 585-595.
- Yap AS, Brieher WM, Gumbiner BM (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **13**: 119-146.
- Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, et al. (1988). Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res* **48**: 137-141.
- Zeng L, Fagotto F, Zhang T, Hsu W, Vasicek TJ, Perry WL 3rd, Lee JJ, Tilghman SM, Gumbiner BM, Costantini F (1997). The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* **90**: 181-192.
- Zhong C, Kinch MS, Burridge K (1997). Rho-stimulated contractility contributes to the fibroblastic phenotype of Ras-transformed epithelial cells. *Mol Biol Cell.* **8**: 2329-2344.
- Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, Raffel C (1998). Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer Res.* **58**: 896-899.
- Zwick E, Bange J, Ullrich A (2002). Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med.* **8**: 17-23. Review.

G ABKÜRZUNGEN

Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien, Proteine und Enzyme

Abb.	Abbildung
a. dest.	Destilliertes Wasser
Amp	Ampicillin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CO ₂	Kohlendioxid
CRIB	<i>Cdc42 / Rac interactive binding</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluoreszein
DTT	Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growthfactor</i>
EGF-Rezeptor	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxymethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-thiogalacto-pyranoside
JNK	c-Jun-aminoternale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
MgSO ₄	Magnesiumsulfat

MMP	Matrix-Metalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natronlauge
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK 1	<i>p21 activated Kinase 1</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologe Domäne
PKC	Proteinkinase C
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>
RNase	Ribonuklease
RTK	Rezeptorproteintyrosinkinase
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLC	Dünnschichtchromatographie
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate</i>
X-Gal	<i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid</i>
z.B.	zum Beispiel

Nukleinsäuren

AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cDNA	Komplementäre DNA
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
P	Phosphat
Phe	Phenylalanin
PI	Phosphatidylinositol
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
Ser	Serin
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin

Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
kD	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
OD	Optische Dichte
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
U	Enzymaktivität (Unit)
sek	Sekunden
v/v	Volumen / Volumen
V	Volt
w/v	Gewicht / Volumen

H PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

1. Publikationen:

Fuchs M, Hutzler P, Brunner I, Schlegel J, Mages J, Reuning U, Hapke S, Duyster J, Hirohashi S, Genda T, Sakamoto M, Überall F, Höfler H, Becker KF, Luber 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**: 129-141.

Fricke E, Hermannstädter C, Keller G, **Fuchs M**, Höfler H, Becker KF, Luber B. Effect of wild-type and mutant E-cadherin on cell proliferation and responsiveness to the chemotherapeutic agents cisplatin, etoposide, and 5-fluorouracil. *Oncology in press*

Kremer M, Quintanilla-Martinez, **Fuchs M**, Gamboa-Dominguez A, Haye S, Kalthoff H, Busch R, Höfler H, Luber B. Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on tumorigenicity and metastasis. *Cancerogenesis, revised version submitted*

2. Kongressbeiträge:

B. Luber, G. Handschuh, **M. Fuchs**, E. Mentele, M. Sakamoto, T. Genda, Y. Ino, T. Yamada, P. Hutzler, S. Hirohashi, H. Höfler, K.-F. Becker.
Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on cell motility.
Poster beim Kongress Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes, Berlin, 02.-04.12.1999

M. Fuchs, G. Handschuh, S. Candidus, P. Hutzler, H. Höfler, K-F. Becker, B. Luber.
Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on actin cytoskeleton organization.
Poster beim 51. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie: GTP-Binding proteins: Central Regulators in Cell Biology, Mosbach, 02.-05.04.2000

B. Luber, G. Handschuh, **M. Fuchs**, E. Mentele, M. Sakamoto, T. Genda, Y. Ino, T. Yamada, P. Hutzler, S. Hirohashi, H. Höfler, K.-F. Becker.
Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on cell motility and actinin-4 localization.
Poster bei der 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Kiel, 07.-10.06.2000
Pathol Res Pract 196, 2000, 401

M. Fuchs, E. Lengyel, G. Handschuh, P. Hutzler, H. Höfler, K-F. Becker, B. Luber.
Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on cellular signalling.
Vortrag bei der Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie,
München, 10.-13.10.2000

M. Fuchs, E. Lengyel, G. Handschuh, P. Hutzler, H. Höfler, K-F. Becker, B. Luber.
Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on cellular signalling.
Poster beim Kongress
Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes 2000,
Berlin 02.-04.11.2000

M. Fuchs, P. Hutzler, U. Reuning, S. Hapke, E. Lengyel, G. Handschuh, M. Sakamoto, T. Genda, S. Hirohashi, J. Schlegel, H. Höfler, K-F. Becker, B. Luber.
Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on cellular signalling and motility.
Poster beim 11. Kongress der Abteilung Experimentelle Krebsforschung (AEK) der
Deutschen Krebsgesellschaft, Heidelberg, 04.-06.04.2001
J Cancer Res Clin Oncol, Volume 127, Supplement 1, 2001, S55

M. Fuchs, P. Hutzler, U. Reuning, S. Hapke, E. Lengyel, G. Handschuh, M. Sakamoto, T. Genda, S. Hirohashi, J. Schlegel, H. Höfler, K-F. Becker, B. Luber.
Tumor-associated E-cadherin mutations affect cell migration behaviour and cellular signalling.
Vortrag bei der 85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie,
Münster 06.-09.06.2001

M. Fuchs, P. Hutzler, I. Brunner, J. Schlegel, J. Mages, U. Reuning, S. Hapke, S. Hirohashi, T. Genda, M. Sakamoto, F. Überall, H. Höfler, K-F. Becker, B. Luber.
Tumor-derived E-cadherin mutations decrease cell adhesiveness and enhance cell motility: role of EGF receptor and PI3-kinase signaling pathways and the small GTPase rac1.
Vortrag beim 6th Joint Meeting: Signal transduction, Receptors, Mediators and Genes, Weimar, 07.-09.11.2002

E. Fricke, C. Hermannstädter, G. Keller, **M. Fuchs**, H. Höfler, K-F. Becker, Birgit Luber.
Effect of wild-type and mutant E-cadherin on cell proliferation and responsiveness to the chemotherapeutic agents cisplatin, etoposide, and 5-fluorouracil.
Poster beim 6th Joint Meeting: Signal transduction, Receptors, Mediators and Genes, Weimar, 07.-09.11.2002

3. Patentanmeldung:

PCT-Patentanmeldung Nr. PCT/EP03/05057 (2003): EGF receptor antagonists in the treatment of gastric cancer (Erfinder: B. Luber, **M. Fuchs**, H. Höfler, F. Fend, A. Gamboa-Dominguez).

DANKSAGUNG

Aufrichtig möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H. Höfler danken, der mir als Direktor des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München (TUM) die Möglichkeit gegeben hat, im Rahmen des SFB 456, Teilprojekt A2, in der Molekularbiologischen Forschungsabteilung meine Dissertation zu erstellen. Die ausgezeichnete Ausstattung seines Instituts hat wesentlich zur Durchführung vieler Experimente und der Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. B. Luber für die Überlassung des Themas der Dissertation und die mehr als hervorragende Betreuung und Unterstützung während des gesamten Projektes. Sie ermöglichte mir u.a. sehr viele Kongressbesuche, die mit ihr und anderen Kollegen immer ein Erlebnis waren, sowie methodische Fortbildungen im Inn- und Ausland. Auch war sie mir eine große Hilfe bei der Etablierung des Motilitäts-Assays. Doch nicht nur die fachliche Unterstützung und die zahlreichen Diskussionen, in denen sie mir die Tumorforschung näher gebracht und mein Interesse für dieses Gebiet geweckt hat, sondern vor allem auch das sehr gute persönliche Verhältnis hat wesentlich zum Fortgang meiner Dissertation beigetragen. Solch eine Betreuung kann ich jedem Doktoranden nur wünschen.

Insbesondere möchte ich mich ganz herzlich bei Frau C. Hermannstädter, die Dritte im Bunde der AG Luber, bedanken, die mir am Ende meiner Dissertation immer sehr hilfsbereit zur Seite gestanden hat und für jedes Ausprobieren neuer Methoden zu begeistern war. Durch ihre stets positive Laune und ausgezeichnete fachliche Kompetenz hat sie nicht nur die schönsten Western-Blot-Analysen und Ergebnisse produziert, sondern vor allem auch für die sehr gute Atmosphäre in unserer AG sowie in der gesamten Forschungsabteilung gesorgt. Ebenso gilt mein Dank auch Frau E. Mentele, Frau A. Gruber und Frau I. Brunner, die mich in einzelnen Abschnitten meiner Dissertation bei der Durchführung vieler Experimente technisch unterstützt haben.

Herrn Dr. rer. nat. habil. K.-F. Becker und Frau Dr. rer. nat. G. Handschuh möchte ich für die Bereitstellung der mit E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Tumorzellen sowie der dazugehörigen Konstrukte bedanken, ohne die meine Dissertation nicht durchführbar gewesen wäre.

Wesentlich zum Gelingen meiner Dissertation haben auch Herr Dr. P. Hutzler und Herr E. Mannweiler aus der GSF (Neuherberg) beigetragen, wofür ich mich aufrichtig bei den beiden bedanken möchte. Sie haben mich jederzeit sehr hilfsbereit bei der Durchführung der Motilitätsversuche und der Immunfluoreszenzaufnahmen am LSM sowie den anschließenden Auswertungen unterstützt und meine Visionen, wie die Filme und Abbildungen am Schluss aussehen sollten, wahr gemacht.

Frau Dr. med. vet. S. Kiesling und Frau Dr. rer. nat. I. Dudeck danke ich vor allem für die gute Freundschaft, die unvergesslichen Cappuccino-Pausen, die hilfreichen Ratschläge, die Namensgebung meiner Leuchtlinge und die geselligen Stunden nicht nur innerhalb des Instituts. Die Gründung des KCs war eine sehr gute

Idee und ich möchte keine Sekunde davon missen. Ich hoffe, wir halten das noch sehr lange durch!

Herrn J. Mages und Frau E. Rosivatz danke ich vor allem für die gute Atmosphäre in unserem Büro, die Hilfsbereitschaft bei Versuchsdurchführungen und die anregenden Diskussionen. Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei allen Kollegen und Ehemaligen aus dem 2. und 3. Stock des Instituts, die ich hier leider nicht alle namentlich aufzählen kann, für die gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors bedanken. Unter diesen Bedingungen war es mir immer eine Freude, hier zu arbeiten.

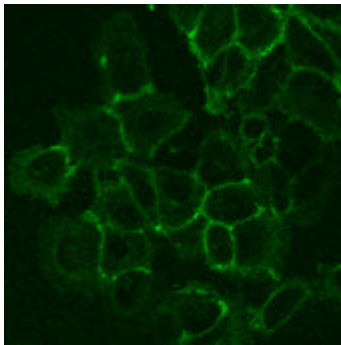
Mein sehr großer Dank gilt auch G. Vollmer und meinem Bruder C. Fuchs für die große Unterstützung in allen Computertechnischen Angelegenheiten, vor allem in meiner schwersten Stunde des Festplattencrashes kurz vor Abgabe der Dissertation. Ohne die beiden hätte ich die Arbeit so, wie sie jetzt ist, nicht mehr hinbekommen. Und natürlich möchte ich mich auch bei allen Freunden außerhalb des Instituts bedanken, die mich mit diversen Aktivitäten vom Laborfrust abgelenkt und mich stets davon überzeugt haben, dass es auch ein Leben außerhalb des Labors gibt.

Zum Schluss möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern danken, die mir das Studium und die Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht haben. Sie waren mir immer eine sehr große Stütze in jeglicher Hinsicht, vor allem auch in den letzten nervenaufreibenden Stunde vor der Abgabe.

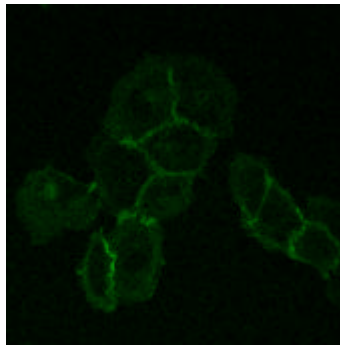
QUICK TIME MOVIES

Zum Öffnen der QuickTimeMovies die Bilder mit einem Doppelklick anklicken.

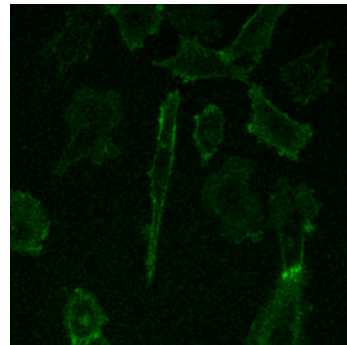
wt-EcadEGFP (Unb, Abb. 42)



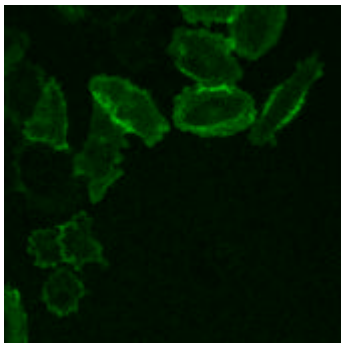
wt-EcadEGFP (Tyr, Abb. 46)



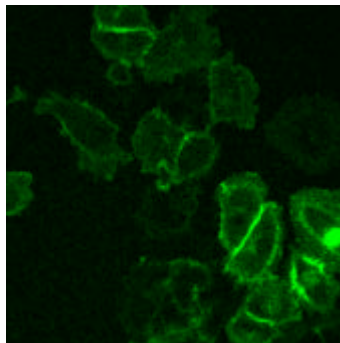
wt-EcadEGFP (EGF, Abb. 48)



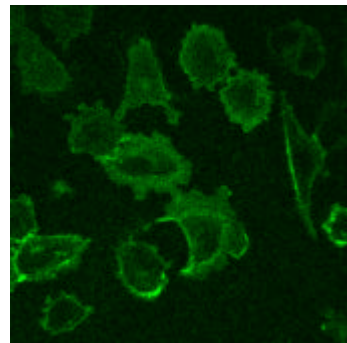
p8-EcadEGFP (Unb1, Abb. 43)



p8-EcadEGFP (Tyr, Abb. 47)



p8-EcadEGFP (EGF, Abb. 49)



p8-EcadEGFP (Unb2, Abb. 41)

