

Charakterisierung des E-Cadherin- Adhäsionskomplexes und der Einfluss von Rho-GTPasen in Lungenkarzinomzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Inga Katharina Repka
aus Hamburg

Gießen 2020

Aus der Medizinischen Klinik IV und V,
unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Andre Menke
2. Gutachter: Prof. Dr. Undraga Schagdarsurengin

Tag der Disputation: 29.09.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Das Lungenkarzinom	1
1.2 Die Zelladhäsion	2
1.3 Cadherine	3
1.4 Der E-Cadherin-Catenin-Komplex	4
1.4.1 E-Cadherin	4
1.4.2 Catenine	5
1.5 Die Funktion der Cadherine in der Tumorgenese und Metastasierung	6
1.6 Rho-GTPasen	7
1.7 Die Funktion der Rho-GTPasen in der Tumorgenese und Metastasierung	9
1.8 Zielsetzung der Arbeit	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Chemikalien	12
2.1.2 Geräte	13
2.1.3 Software	13
2.1.4 Molekulargewichtsmarker	14
2.1.5 Plasmide	14
2.1.6 Transfektionsreagenzien	14
2.1.7 Zelllinien	14
2.1.8 Primärantikörper	15
2.1.9 Sekundärantikörper	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Kultivierung von humanen, adhärenen Zellen	17
2.2.2 Passagieren von Zellen	18
2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	18
2.2.4 Plasmidgewinnung	19
2.2.5 Transiente Transfektion von Lungenkarzinomzellen	19
2.2.6 Herstellung von Zelllysaten	21
2.2.7 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)	22
2.2.8 Immunpräzipitation	22
2.2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.2.10 Coomassie-Färbung	25
2.2.11 Immunoblotting	25
2.2.12 Ponceaurot-Färbung	26

2.2.13	Immunfärbung	26
2.2.14	Proteindetektion mittels Chemilumineszenz	27
2.2.15	Proteindetektion mittels Nah-Infrarot-Lumineszenz.....	27
2.2.16	Entwicklung mittels Alkalischer Phosphatase	28
2.2.17	Immunfluoreszenzfärbung.....	28
2.1.18	Densitometrische Auswertung	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Analyse des Proteingehaltes von Cadherinen und Cateninen in Lungenkarzinomzellen	30
3.1.1	Analyse des Proteingehaltes von Cadherinen	30
3.1.2	Analyse des Proteingehaltes von Cateninen.....	32
3.2	Nachweis des E-Cadherin-Catenin-Komplexes in A549, H358, HTB-55 und H23-Zellen.....	33
3.3	Lokalisation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes in H358, H23 und A549- Zellen.....	35
3.4	Einfluss von RhoA und RhoC auf den E-Cadherin-Adhäsionskomplex.....	40
3.4.1	Analyse des Proteingehaltes von RhoA und RhoC in Lungenkarzinomzellen	40
3.4.2	Einfluss von RhoA und RhoC auf den Proteingehalt von E- Cadherin und β -Catenin in H358-Zellen.....	41
3.4.3	Einfluss von RhoA und RhoC auf den Proteingehalt von E- Cadherin und β -Catenin in H23-Zellen.....	44
3.4.4	Einfluss von RhoA und RhoC auf den Proteingehalt von E- Cadherin und β -Catenin in A549-Zellen.....	47
3.4.5	Einfluss von RhoA und RhoC auf den E-Cadherin-Catenin- Komplex in A549-Zellen	49
4	Diskussion.....	52
4.1	Charakterisierung des E-Cadherin-Catenin-Adhäsionskomplexes	53
4.2	Expression der Rho-GTPasen RhoA und RhoC in Lungenkarzinomzellen..	57
4.3	Einfluss der kleinen Rho-GTPasen auf den E-Cadherin-Catenin-Komplex .	58
4.3.1	Einfluss von RhoA	58
4.3.2	Einfluss von RhoC	60
5	Zusammenfassung.....	62
6	Summary	64
7	Literaturverzeichnis	65
8	Eidesstattliche Erklärung	73
9	Danksagung.....	74

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Bicinchoninsäure
CBD	<i>β-catenin binding site</i>
CDC42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CDH1	<i>Cadherin-1 Gen von E-Cadherin</i>
CMF	Calcium-Magnesium-frei
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
EC	Extrazelluläre Domäne
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
GAP	<i>GTPase activating factor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEF	<i>guanin nucleotid exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
m/V	Masse pro Volumen
mk	monoklonal
M	Mol
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
p120ctn	p120-Catenin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
Pk	Polyklonal
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rho	<i>Ras homologue</i>
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i>
WB	Westernblot

1 Einleitung

1.1 Das Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom (syn. Bronchialkarzinom) ist laut des Robert Koch-Instituts der zweithäufigste bösartige Tumor bei Männern und der dritthäufigste bei Frauen. Mit ca. 45.000 Todesfällen im Jahr 2013, was 25 % aller Krebstodesfälle bei Männern und 15 % aller Krebstodesfälle bei Frauen entspricht, ist es die mit Abstand häufigste Krebstodesursache in Deutschland (Robert Koch-Institut 2016). Auch in der globalen Krebstodesstatistik der *International Agency for Research in Cancer* steht das Lungenkarzinom an erster Stelle. Circa ein Fünftel aller Krebstodesfälle lassen sich auf das Lungenkarzinom zurückführen, was im Jahre 2018 weltweit 1,76 Millionen Tote bedeutete und insgesamt 18,4 % aller Krebstodesfälle ausmachte (The Global Cancer Observatory; International Agency for Research in Cancer 2018). Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen 55 und 65 Jahren. Die Inzidenz und die Mortalität zeigen in Deutschland seit 1990 geschlechtsspezifische Veränderungen. In den letzten Jahrzehnten sank die Inzidenz und die Mortalität bei Männern wohingegen sie bei Frauen stark zunahm. Diese gegenläufige Entwicklung wird auf die Veränderung der Rauchgewohnheiten und dem zunehmenden Anteil an rauchenden Frauen zurückgeführt (Robert Koch-Institut 2016). Die Rauchexposition wird als bedeutendster Risikofaktor angesehen, wobei die Entstehung des Lungenkarzinoms in ca. 85 % der Fälle auf Tabakrauch zurückzuführen ist (IARC 2003; Travis et al. 2004). Auch für die weitere Prognose eines Patienten ist es von entscheidender Bedeutung, ob das Rauchen eingestellt oder fortgeführt wird. Ferketich et al. zeigten 2013 in einer klinischen Studie deutlich längere Überlebensraten bei Patienten, die nach der Diagnosestellung eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) das Rauchen einstellten, gegenüber Patienten die weiterhin rauchten (Ferketich et al. 2013).

Der Begriff Lungenkarzinom (syn. Bronchialkarzinom) beschreibt maligne Neoplasien, welche aus dem respiratorischen Epithel der großen und kleinen Atemwege sowie der Alveolen entstehen. Histologisch wird das Lungenkarzinom in einen kleinzelligen Typ (*small cell lung cancer* = SCLC) und einen nicht-kleinzelligen Typ (*non-small cell lung cancer* = NSCLC) unterteilt. Zu dem Typ des NSCLC zählen Plattenepithelkarzinome,

Adenokarzinome mit ihrer Sonderform dem bronchoalveolären Karzinom und großzellige Lungenkarzinome. Die Unterscheidung zwischen SCLC und NSCLC ist von besonderer Bedeutung, da sie entscheidend das therapeutische Vorgehen und die Prognose des Patienten bestimmt (Travis 2011a). Nach biotisch oder zytologischer Gewinnung und histologischer Aufbereitung des Tumorgewebes kann die Diagnose Lungenkarzinom meist durch den Pathologen gestellt werden. Die vier Säulen der Therapie des Lungenkarzinoms umfassen die radikale Resektion, die Bestrahlung, die Chemotherapie und einer der Pathologie des Tumors angepassten medikamentösen Therapie. Sie richtet sich besonders nach dem histologischen Typ und dem Tumorstadium, wobei häufig eine Kombination der Therapieoptionen angewandt wird. Bei Diagnosestellung befinden sich ca. 70 % der Patienten mit Lungenkarzinom bereits in einem fortgeschrittenen inoperablem Zustand, was die Prognose, gemessen an der 5-Jahres-Überlebensrate, deutlich verschlechtert (Travis 2011b). Die amerikanische Krebsstatistik zeigte, dass die 5-Jahres-Überlebensrate bei Auftreten von Fernmetastasen deutlich sinkt. Während Tumore, die auf das Organ lokalisiert bleiben, eine 5-Jahres-Überlebensrate von 56 % aufweisen, liegt sie bei regional metastasierten Tumoren bei 27 % und bei Auftreten von Fernmetastasen nur noch bei 4 % (Siegel et al. 2016).

Besondere Bedeutung in der Pathogenese des Lungenkarzinoms kommt dem Adhäsionsprotein E-Cadherin zu. Bereits bekannt ist, dass gering differenzierte Lungenkarzinome und bereits metastasierte Lungenkarzinome deutlich geringere Mengen an E-Cadherin aufweisen als gut differenzierte Karzinome wie das bronchoalveoläre Lungenkarzinom (Lim et al. 2000; Bremnes et al. 2002). Zudem führt eine reduzierte oder fehlende Expression von E-Cadherin in Lungenkarzinomzellen zu einer verstärkten lokalen Invasion der Tumorzellen, Metastasenbildung und korreliert mit einer geringeren Überlebenszeit, was E-Cadherin zu einem wichtigen prognostischen Parameter des Lungenkarzinoms macht (Birchmeier und Behrens 1994; Bremnes et al. 2002; Deeb et al. 2004; Frixen et al. 1991; Lim et al. 2000; Takeichi 1991).

1.2 Die Zelladhäsion

Durch die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten werden Zellen dazu befähigt sich aneinanderzulagern und als eine Funktionseinheit ein Gewebe auszubilden. Nach Funktion und Struktur werden drei unterschiedliche Zellkontakttypen unterschieden. Zu ihnen

zählen die Verschlusskontakte (*tight junctions*), Kommunikationskontakte (*gap junctions*) und Adhäsionskontakte (*adherens junctions*). Alle Zellkontakte bestehen aus einem Transmembranprotein und intrazellulären Ankerproteinen. Die Transmembranproteine stellen mit ihrer extrazellulären Domäne die Verbindung zu einer Nachbarzelle oder der Extrazellulärmatrix her und die Ankerproteine interagieren intrazellulär mit dem Zytoskelett. Zwei wichtige Vertreter der Adhäsionskontakte sind die Desmosomen, welche mit Intermediärfilamenten verbunden sind und die Adhäsionskontakte (*adherens junctions*), welche mit Aktinfilamenten interagieren und in Epithelien meist in Form einer Zonula adhaerens ausgebildet sind (Lüllmann-Rauch 2012). Die Zonula adhaerens stellt eine gürtelförmige Verdichtung von vielen Adhäsionskontakten dar. Auf diese Weise erlangt das Gewebe starken mechanischen Halt und die Zellen ihre Polarität, durch welche sie in eine apikale und basale Seite aufgeteilt wird (Harris, Tony J. C. und Tepass 2010).

1.3 Cadherine

Cadherine sind transmembrane Glykoproteine der Zelloberfläche und stellen zentrale Bestandteile funktionsfähiger Adhäsionskontakte dar. Sie bilden calciumabhängig stabile homophile Verbindungen mit gleichartigen Cadherinen der Nachbarzelle aus. Hierbei lagern sich die Cadherine einer Zelle zu *cis*-Multimeren zusammen, welche wiederum mit anderen *cis*-Multimeren benachbarter Zellen *trans*-Multimere ausbilden (Brasch et al. 2012; van Roy und Berx 2008). Die Superfamilie der Cadherine unterteilt sich in sechs Untergruppen, zu denen die klassischen Typ I Cadherine, die atypischen Typ II Cadherine, Desmocolline, Desmogleine, Protocadherine und Cadherin-ähnliche Proteine gehören. Die am besten charakterisierten Cadherine sind die Typ I Cadherine mit ihren Mitgliedern E-, N-, P-, und R-Cadherin (Nollet et al. 2000). Die Präfixe beziehen sich hierbei auf die Gewebe, in denen die Proteine zum ersten Mal beschrieben worden sind und vorwiegend exprimiert werden. Folglich wird E-Cadherin vor allem in epithelialen Zellen und N-Cadherin in neuronalen und muskulären Zellen exprimiert (Nollet et al. 2000). Der Nachweis von P-Cadherin gelang der Arbeitsgruppe von Nose und Takeichi 1986 in großer Menge in der Plazenta von Mäusen (Nose und Takeichi 1986). In menschlichen Zellen wird P-Cadherin vor allem in den basalen Zellen der Epidermis exprimiert, wohingegen E-Cadherin vor allem in den oberen epithelialen Schichten zu

finden ist (Nollet et al. 2000). Die Expression der unterschiedlichen Cadherine ist jedoch nicht auf einzelne Gewebearten beschränkt, sondern richtet sich vor allem nach der Entwicklungsstufe und Funktion der einzelnen Zellen und Gewebearten (Halbleib und Nelson 2006).

Die Expression von Cadherinen ist für den Organismus lebenswichtig und spielt eine bedeutende Rolle während der Embryogenese, Morphogenese und Organentwicklung sowie der Entwicklung neurologischer Strukturen (Riethmacher et al. 1995; Harris, Tony J. C. und Tepass 2010; Halbleib und Nelson 2006). Zudem sind die Cadherine in viele Signalwege involviert, welche in besonderem Maße die Umstrukturierung und Organisation des Aktin-Zytoskeletts betreffen (Perez et al. 2008).

1.4 Der E-Cadherin-Catenin-Komplex

Die Funktionseinheit der Adhäsionskontakte (*adherens junctions*) in epithelialen Zellen ist der transmembranäre E-Cadherin-Catenin-Komplex.

1.4.1 E-Cadherin

E-Cadherin gehört zu den klassischen Typ I Cadherinen und stellt den Prototyp dieser Familie dar. Es wird in einer Vielzahl von epithelialen Geweben exprimiert. Das in seiner reifen Form ca. 120 kDa große Protein E-Cadherin, welches vom *CDH1*-Gen kodiert wird, enthält eine extrazelluläre, eine transmembranäre und eine intrazelluläre Domäne (Blaschuk et al. 1990; Nollet et al. 2000; van Roy und Berx 2008). Die hochkonservierte intrazelluläre Domäne, bestehend aus 150 Aminosäuren, vermittelt durch die Bindung von Ankerproteinen, den Cateninen, die Anbindung an das Zytoskelett. Sie enthält eine N-terminale juxtamembrane Domäne (JMD) und eine C-terminale *β -catenin binding site* (CBD) (van Roy und Berx 2008). An die JMD bindet p120-Catenin (p120ctn), welches den Cadherin-Catenin-Komplex stabilisiert und ihn vor endozytotischem Abbau schützt (Reynolds 2010). Über die CBD interagiert Cadherin mit β -Catenin oder γ -Catenin (homolog zu Plakoglobin). Über assoziiertes α -Catenin wird anschließend die Verbindung zum Aktin-Zytoskelett hergestellt (van Roy und Berx 2008).

Über die extrazelluläre Domäne, welche aus 550 Aminosäuren besteht, lagern sich die Cadherine zusammen und stellen so die Zelladhäsion untereinander her (van Roy und Berx 2008). Alle Mitglieder der klassischen Typ I Cadherine weisen genau 5 *EC-repeats* in ihrer extrazellulären Domäne auf (Nollet et al. 2000). Essentiell für die Ausbildung und Stabilisierung von Adhäsionskomplexen ist die Bindung von Ca^{2+} -Ionen (Ozawa et al. 1990). Die aufeinanderfolgenden EC-Domänen werden jeweils durch die Bindung von drei Calcium-Ionen verknüpft. Diese Calciumabhängigkeit verlieh den Cadherinen ihren Namen (*Ca²⁺-dependent adhesion molecules*) (Brasch et al. 2012).

1.4.2 Catenine

Die Verbindung zum Zytoskelett wird intrazellulär durch Ankerproteine der Catenin-Familie hergestellt. Zu ihnen gehören α -Catenin, β -Catenin, p120-Catenin (p120ctn) und γ -Catenin.

β -Catenin ist ein 96 kDa großes Protein und gehört zur Familie der *armadillo repeat proteins*. Es interagiert durch die *Armadillo-repeats* direkt mit den Cadherinen am intrazellulären C-terminalen Ende und bewirkt somit die Verankerung der Cadherine (Xu und Kimelman 2007). Die Bindung von β -Catenin an E-Cadherin entsteht bereits früh im endoplasmatischen Retikulum und ermöglicht deren Transport zur Zelloberfläche (Chen et al. 1999). In Verbindung mit dem Cadherin-Catenin-Komplex an der Zellmembran führt β -Catenin eine adhäsive Funktion aus, stabilisiert die Zelle im Gewebeverbund und kann die Tumorentstehung verhindern (Li et al. 2014). β -Catenin liegt zusätzlich zu seiner membrangebundenen Form auch frei im Zytosol vor und spielt dort eine wichtige Rolle in Signalwegen der Zellproliferation. Bei Aktivierung des Wnt-Signalweges akkumuliert β -Catenin, wandert in den Nukleus und bindet Proteine der Tcf/LEF-Familie. Dieser Komplex bindet an die DNA und induziert die Transkription von Genen, welche den Zellzyklus, die Zellproliferation und somit die Tumorgenese stimulieren (Nagar et al. 1996). Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2017 verglich mehrere Studien, in denen die prognostische Bedeutung der Lokalisation von β -Catenin in NSCLC untersucht wurde. Aus dieser Metaanalyse geht hervor, dass zytosolisch lokalisiertes β -Catenin in NSCLC mit einer schlechteren Prognose und membranös lokalisiertes β -Catenin mit einer guten Prognose einhergeht (Jin et al. 2017).

α -Catenin ist ein 102 kDa großes Protein. Es agiert als *Linker*-Protein zwischen β -Catenin und Aktin und stellt somit die Verbindung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes an das Zytoskelett her (Harris, Tony und Tepass 2010). Es kann dabei direkt oder indirekt an Aktin binden. Als mögliche Interaktionspartner zwischen α -Catenin und Aktin sind Vinculin, Afadin, Aktinin, Formin und EPLIN in der Diskussion (Gates und Peifer 2005).

P120-Catenin (p120ctn) gehört wie β -Catenin zur Familie der *armadillo repeat domain proteins* und interagiert mit E-Cadherin an der juxtramembranären Region (Reynolds 2010). Vom humanen Protein p120ctn existieren verschiedene Isoformen. Diese werden durch die Verwendung vier verschiedener Startkodons (Startkodon 1, 2, 3 oder 4) sowie durch die unterschiedliche Kombination dreier Exone (Exon A, B oder C) gebildet. Hiernach richtet sich auch die Nomenklatur der einzelnen Isoformen (bspw. p120ctn-Isoform 1 ABC) (Keirseblick et al. 1998).

Für die Aufrechterhaltung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes ist p120ctn unverzichtbar. Fällt die Bindung von p120ctn an E-Cadherin weg, können Faktoren wie Ubiquitin ligase Hakai und Clathrin an E-Cadherin binden, was zur Internalisierung und Endozytose von E-Cadherin und zur Degradation des Komplexes führt (Menke und Giehl 2012; Reynolds 2010). Des Weiteren induziert p120ctn die seitliche Vernetzung der E-Cadherin Homodimere, wodurch ein charakteristisches Reißverschlussprinzip entsteht und ein starker mechanischer Halt gewährleistet wird (Menke und Giehl 2012).

1.5 Die Funktion der Cadherine in der Tumorgenese und Metastasierung

Im Gegensatz zu benignen Zellen weisen maligne Zellen ein invasives Wachstum auf und haben die Fähigkeit Metastasen zu bilden. Während des Prozesses der Metastasierung lösen sich die Zellen aus ihrem Gewebsverbund, durchbrechen die Basalmembran und infiltrieren das umliegende Gewebe. Anschließend können die Tumorzellen über den Vorgang der Intravasation in Lymph- oder Blutgefäße einbrechen, in andere Organe wandern und dort Fernmetastasen ausbilden (Menke und Giehl 2012). Voraussetzung für den Vorgang der Metastasierung ist, dass die Zelle ihren epithelialen Phänotyp verliert und mesenchymale Charakteristika annimmt um eine erhöhte Invasivität und mig-

ratorische Aktivität zu erlangen. Dieser Prozess beschreibt die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). EMT ist jedoch nicht nur ein onkogener, sondern primär ein physiologischer Vorgang und spielt während der Implantation, Embryogenese, Organentwicklung sowie in der Wundheilung eine wichtige Rolle (Kalluri und Weinberg 2009). Ein entscheidender Schritt während der EMT ist der Verlust von E-Cadherin und die dadurch resultierende Schwächung der Adhäsionskomplexe, was die Ablösung der Zelle aus ihrem Gewebsverbund erleichtert (Birchmeier und Behrens 1994; Kalluri und Weinberg 2009). Interessanterweise ist in manchen Tumorzellen neben der verminderten Expression von E-Cadherin eine erhöhte Expression von mesenchymalen Cadherinen, wie Cadherin-11 oder N-Cadherin zu beobachten (Halbleib und Nelson 2006).

Um sich in anderen Organen erneut anzuheften, kann die transformierte mesenchymale Zelle im Anschluss an die EMT den entgegengesetzten Prozess, also die mesenchymal-epitheliale Transition durchlaufen (MET) (Auersperg et al. 1999). Die Expression von E-Cadherin wird hierbei hochreguliert, es bilden sich neue Adhäsionskontakte aus und die Zelle nimmt erneut ihren epithelialen Phänotyp an (Chao et al. 2010).

In Tumorzellen, wie auch im Lungenkarzinom, ist die Expression von E-Cadherin und assoziierten Cateninen im Vergleich zu benignem Gewebe vermindert. Dies resultiert häufig in einer Schwächung der Adhäsionskomplexe und die Tumorzelle kann dadurch ein erhöhtes Invasions- und Migrationspotential erlangen (Liu et al. 2008). Eine Dys- bzw. Runterregulation der E-Cadherin-Expression kann über verschiedenste Mechanismen entstehen: genetische Mutation, epigenetische Mutationen, die posttranslationale Modifizierung, verstärkter Abbau durch Endozytose oder durch eine erhöhte induzierte Expression mesenchymaler Cadherine (zusammengefasst in van Roy und Berx 2008).

1.6 Rho-GTPasen

Rho-GTPasen sind in allen eukaryontischen Zellen enthalten und gehören der Ras-Superfamilie an. Bekannte Mitglieder sind die Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 mit einer Größe von 21-25 kDa (Wheeler und Ridley 2004; Ridley 2013; Parri und Chiarugi 2010). In der Zelle sind Rho-GTPasen im Zytoplasma oder an der Zellmembran lokalisiert, was von ihrer posttranslationalen Modifikation abhängt. Damit Rho-GTPasen ihre Funktionen an der Zellmembran ausüben können, wird posttranslational

eine Lipid-Gruppe, die sogenannte Prenyl-Gruppe am C-Terminus hinzugefügt, welche der Verankerung an der Zellmembran dient und den Rho-GTPasen ermöglicht mit Regulatoren und mit Effektorproteinen zu interagieren (Parri und Chiarugi 2010; Ridley 2013).

Alle Rho-GTPasen fungieren als molekulare Schalter und wechseln zwischen einem GDP-gebundenen und einem GTP-gebundenen Zustand, wobei sie nur im GTP-gebundenen Zustand aktiv sind. Die Aktivierung der Rho-GTPasen wird durch den Austausch von GDP zu GTP durch *guanin nucleotid exchange factors* (GEFs) erzielt. Die Inaktivierung, bedingt durch die Hydrolyse des γ -Phosphats von GTP, durch *GTPase activating factors* (GAPs) katalysiert (Wheeler und Ridley 2004; Parri und Chiarugi 2010; Ridley 2013). Weitere negative Regulatoren, welche die Rho-GTPasen in ihrem inaktiven GDP-gebundenen Zustand festhalten, sind die *Rho guanine nucleotide dissociation factors* (GDIs). Durch eine Bindung an die Lipid-Gruppe der Rho-GTPasen bewirken sie deren Dissoziation von der Plasmamembran und halten die Rho-GTPasen in ihrem inaktiven GDP-gebundenen Zustand fest (Ridley 2013; Parri und Chiarugi 2010; Wheeler und Ridley 2004).

Rho-GTPasen sind essentiell an der Fähigkeit der Zelle zu migrieren und der Ausbildung und Umstrukturierung von Adhäsionskontakten beteiligt. Dies geschieht vor allem indirekt durch die Regulation des Aktin-Zytoskeletts (Ridley 2013; Parri und Chiarugi 2010; Wheeler und Ridley 2004; Menke und Giehl 2012; Harris, Tony J C und Tepass 2010). Während der Ausbildung neuer Adhäsionskontakte ist zunächst Rac aktiviert. Rac organisiert die Ausbildung von Zellfortsätzen, den Lamellipodien. Über diese Zellfortsätze treten benachbarte Zellen in Kontakt und E-Cadherin akkumuliert an der Membran der Lamellipodien. Anschließend erfolgt die Aktivierung von RhoA. RhoA bewirkt durch die Kontrolle von kontraktile Stressfasern, welche durch eine Bündelung von Aktin und Myosin-II entstehen, anschließend die korrekte Formation der Adhäsionskontakte (Yamada und Nelson 2007).

Im Gegenzug sind auch Cadherine in der Lage Rho-GTPasen zu regulieren. Beispielsweise zeigte die Arbeitsgruppe von Noren et al., dass Cadherine die Aktivität von RhoA inhibieren können und dies vermutlich durch eine Aktivierung von p190RhoGAP induziert wird (Noren et al. 2003). Die Arbeitsgruppe von Asnaghi et. al kam zu ähnlichen Ergebnissen und zeigte, dass Tumorzellen des NSCLC, welche E-Cadherin überexpri-

mieren, eine geringere Wachstumsrate und verminderte Zellmigration aufweisen. Dieser Effekt wurde durch die verminderte Expression der Rho-GTPasen RhoA und Cdc42 ausgelöst, welche wiederum durch p190RhoGAP und DLC-1 negativ reguliert werden (Asnaghi et al. 2010).

1.7 Die Funktion der Rho-GTPasen in der Tumorgenese und Metastasierung

Es sind drei Rho Isoformen bekannt: RhoA, RhoB und RhoC, welche in über 85 % ihrer Aminosäuresequenz identisch sind (Ridley 2013; Wheeler und Ridley 2004). Trotz ihrer ähnlichen Struktur können sie unterschiedliche Funktionen in der Zelle ausüben und werden durch verschiedene GAPs und GEFs reguliert. RhoA und RhoC haben bedeutenden Einfluss auf die Kontraktilität des Aktomyosinskeletts und auf die Zellpolarität, während RhoB die Apoptose der Zellen fördert und lange Zeit eher als Tumorsuppressorprotein angesehen wurde (Ridley 2013). In Tumorzellen kommt den kleinen GTPasen RhoA und RhoC eine besondere Bedeutung zu, was vor allem durch deren Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten deutlich wird (zusammengefasst in Karlsson et al. 2009). Auch für Tumorzellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) wurde bereits gezeigt, dass RhoC auf mRNA-Level und auf Proteinlevel verstärkt exprimiert wird und zudem die Expression von RhoC positiv mit der Invasion in lymphatische sowie Blutgefäße korreliert (Shikada et al. 2003). Die Deregulation der Rho-GTPasen während der Tumorentstehung wird bisher auf die veränderten Expressionslevel und Aktivierung zurückgeführt, da bisher keine Mutationen in den kodierenden Genen gefunden wurden (Karlsson et al. 2009). RhoC wurde in einem Screening von Genen als entscheidender Marker für das Metastasierungspotential in Melanomzellen entdeckt (Clark et al. 2000). Nachfolgende Studien konnten die metastasierungsfördernde Eigenschaft von RhoC bestätigen, sowie eine Überexpression von RhoC in Karzinomzellen mit einer erhöhten Lymphknoteninfiltration, geringeren Differenzierungsstadien und einer geringeren Überlebenszeit der Patienten in Zusammenhang bringen (Hakem et al. 2005 (Wang et al. 2004, Bellovin et al. 2006). Dieser Effekt wird sicher auch begünstigt durch den stimulierenden Effekt von RhoC auf angiogenetische Faktoren wie beispielsweise den VEGF-Faktor, was zu einer erhöhten Vaskularisierung des Tumors führt (van Golen et al. 2000, Wang et al. 2013). Eine Studie von Hakem et al. zeigte,

dass die Deletion von RhoC keinen Effekt auf die Tumorentstehung bzw. das Zellwachstum hat, aber das Metastasierungspotential deutlich geschwächt wurde (Hakem et al. 2005). Bellovin et al. fanden heraus, dass während der EMT die Expression von RhoC stimuliert wird und im Gegensatz dazu die Expression von RhoA abnimmt. Zudem beschreibt diese Studie einen Zusammenhang zwischen der Überexpression von RhoC und der Dislokation von E-Cadherin von der Membran (Bellovin et al. 2006).

RhoA hat über die Regulation des Aktin-Zytoskeletts einen bedeutenden Einfluss auf die mesenchymale Migration sowie die Ausbildung und Formation der Adhäsionskontakte. Simpson et al. konnten 2004 in einer Studie mit Brustkarzinomzellen zeigen, dass RhoA die Zellinvasion hemmt und RhoC die Zellinvasion fördert (Simpson et al. 2004). Ähnliche Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe von Giehl et al., bei der in Pankreaskarzinomzellen eine Überexpression von RhoC in einer gesteigerten Migration und Invasion der Zellen resultierte, wohingegen die Überexpression von RhoA eine Verminderung bewirkte (Dietrich et al. 2009). In einer Studie von Asnaghi et al. wurde jedoch durch die Inhibition von RhoA-GTP die Zellmigration von NSCLC Zellen stark reduziert, was in Lungenkarzinomzellen eher auf eine Invasions- sowie migrationsfördernde Eigenschaft von RhoA schließen lässt (Asnaghi et al. 2010). Auch die Arbeitsgruppe von Yan et al. kam zu dem Schluss, dass in Tumorzellen des Zungenkarzinoms eine Inhibition von RhoA die Migration und Invasion hemmt (Yan et al. 2014).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Über Adhäsionskontakte lagern sich Zellen zu einem Gewebe zusammen und erlangen starken mechanischen Halt untereinander. Um sich aus dem Gewebsverbund lösen zu können, ist eine Auflösung der adhäsiven Strukturen und ihrer Bestandteile notwendig, was ein entscheidendes Merkmal maligner und migrierender Zellen ist. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der Bestandteile des Adhäsionskomplexes, die Cadherine und Catenine, in Lungentumorzellen zu untersuchen und anschließend in ausgewählten Zellen den E-Cadherin-Catenin-Adhäsionskomplex nachzuweisen.

Rho-GTPasen sind als Regulatoren der Migration und Zelladhäsion bereits lange in der Literatur beschrieben. Jedoch ist bisher wenig darüber bekannt, welche Auswirkungen die kleinen Rho-GTPasen RhoA und RhoC in Lungenkarzinomzellen auf den Adhäsions-

onskomplex haben und ob dies zu einer gesteigerten Zellinvasion und Migration der Zelle führen könnte. Aus diesem Grund sollte durch eine Überexpression von RhoA und RhoC nach transienter Transfektion der Einfluss von RhoA und RhoC auf den E-Cadherin-Catenin-Komplex in Lungenkarzinomzellen untersucht werden. Das Ziel dieser Arbeit ist es, neue Erkenntnisse über die Regulation der Adhäsionskomplexe durch die Rho-GTPasen RhoA und RhoC in Lungenkarzinomzellen zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth, Sigma Aldrich, Thermo Scientific, Acros Organics, Serva Electrophoresis, Merck Millipore, AppliChem, VWR International oder Riedel-de Haen in der höchsten erhältlichen Reinheit bezogen.

Substanz	Hersteller
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Pierce BCA <i>Protein Assay Reagent A</i>	Thermo Scientific, Schwerte
5-Brom-4-Chlor- Indolylphosphat (BCIP)	Carl Roth, Karlsruhe
4-Nitroblau Tetrazolium Chlorid (NBT)	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant blue	Merck Millipore, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-bisaminoethylether-N', N', N', N'-Tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Dulbeccos's modified Eagle medium</i> (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt
Mowiol	Calbiochem by Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Nonidet P40 (NP40)	Roche, Mannheim
OptiMEM	Invitrogen, Darmstadt
PefaBloc	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S Sodium salt	Sigma, Taufkirchen
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Rotiphorese Gel A (30 % Acrylamidlösung)	Carl Roth, Karlsruhe
2 % Bisacrylamidlösung	Carl Roth, Karlsruhe
Skim Silk Powder	Sigma, Taufkirchen
N', N', N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	AppliChem, Darmstadt
Tris-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X100	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

2.1.2 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16 R	Thermo Scientific, Schwerte
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Labofuge 400R	Thermo Scientific, Schwerte
Pipetman Pipetten 10µl, 20µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Middleton (USA)
CO ₂ -Inkubator HERAcell 150i	Thermo Scientific, Schwerte
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Inverses Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81	Olympus, Hamburg
Vertikale Elektrophoresekammer	VWR, Darmstadt
Licor Odyssey SA	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Fusion SL4-3500.WL (<i>Chemiluminescence Imagingssystem</i>)	Vilber Lourmat, Eberhardzell

2.1.3 Software

Bezeichnung	Hersteller
Fusion SL (Version 15.18)	Vilber Lormat, Eberhardzell
Image Studio Lite 5.0.21	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

2.1.4 Molekulargewichtsmarker

Bezeichnung: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Bestellnummer: 26619 Hersteller: Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Molekulargewicht
170 kDa
130 kDa
100 kDa
70 kDa
55 kDa
40 kDa
35 kDa
25 kDa
15 kDa
10 kDa

2.1.5 Plasmide

Bezeichnung	Bezugsquelle
pEGFP-C1	Addgene, Teddington, UK
pEGFP-C2 RhoA WT	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C1 RhoC WT	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Klaudia Giehl

2.1.6 Transfektionsreagenzien

Bezeichnung	Hersteller
jetPEI DNA Transfection Reagent	Polyplus Transfection, New York, USA
NanoJuice Transfection Kit	Merck Millipore, Darmstadt

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Wachstum	Herkunft
A427	Humanes Lungenadenokarzinom	adhärent	ATCC-Nr: HTB-53
A549	Humanes Lungenadenokarzinom	adhärent	ATCC-Nr:

			CCL-185
Colo 699	Humanes Lungenadenokarzinom	adhärent	DSMZ-Nr: ACC 196
H1688	Humanes kleinzelliges Lungenkarzinom (Lebermetastase)	adhärent	ATCC-Nr: CCL-257
HTB-55 (Calu-3)	Humanes Lungenadenokarzinom	adhärent	ATCC-Nr: HTB-55
H2122	Humanes Lungenadenokarzinom	adhärent	ATCC-Nr: CRL-5985
H23	Humanes Lungenadenokarzinom	adhärent	ATCC-Nr: CRL-5800
H358	Humanes bronchoalveoläres Lungenkarzinom	adhärent	ATCC-Nr: CRL-5807
SCLC-21H	Humanes kleinzelliges Lungenkarzinom	in Suspension	CLS-Nr: 300225

Die Beschreibung der verwendeten Zelllinien wurde der ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassan, USA), der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) und der CLS (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim) entnommen.

2.1.8 Primärantikörper

Antigen	Aus Spezies	Verdünnung	Hersteller/ Bestellnummer
β -Aktin	Maus (mk)	IB 1:5000 IF: 1:500	Sigma A-5441
E-Cadherin	Maus (mk)	IB: 1:40000 IF: 1:200	BD Bioscience 610182
N-Cadherin	Maus (mk)	IB: 1:2000 IF: 1:100	BD Bioscience 610920
P-Cadherin	Maus (mk)	IB: 1:2000 IF: 1:100	Abcam Ab19350
Cadherin-11	Kaninchen (pk)	IB: 1:250	US Biological C0107-08
α -Catenin	Maus (mk)	IB: 1:1000 IF: 1:50	BD Bioscience 610194
α -Catenin	Kaninchen (pk)	IB: 1:50000 IF: 1:500	Sigma C2206
β -Catenin	Maus (mk)	IB: 1:2000	BD Bioscience

		IF: 1:50	610152
β -Catenin	Kaninchen (pk)	IB: 1:5000 IF: 1:500	Sigma C2206
γ -Catenin	Maus (mk)	IB: 1:4000 IF: 1:200	Transduction C26220
P120ctn	Maus (mk)	IB: 1:1000 IF: 1:100	BD Bioscience P17920
P120ctn	Kaninchen (pk)	IB: 1:1500 IF: 1:100	Santa Cruz cc-1101
GFP	Maus (mk)	IB: 1:1000	Roche 11814460001
RhoA	Maus (mk)	IB: 1: 500	Santa Cruz Sc-418
RhoC	Maus (mk)	IB: 1:200	Santa Cruz Sc-26480

IB: Immunoblot, IF: Immunfluoreszenz, mk: monoklonal, pk: polyklonal

2.1.9 Sekundärantikörper

Antigen	Gekoppelt mit	Verdünnung	Hersteller/ Bestellnummer
Maus IgG	Alkalische Phosphatase	IB: 1:5000	Sigma A-3562
Maus IgG	Peroxidase	IB: 1:5000	Sigma#A-4416
Maus IgG	Cy3	IF: 1:1000	Dianova 115-165-003
Maus IgG	IRDye 680 LT	IB: 1:80000 – 1:1000000	LI-COR Biosciences 925-68022
Maus IgG	IRDye 800 CW	IB: 1:80000 – 1:100000	LI-COR Biosciences 925-32212
Kaninchen IgG	Alkalische Phosphatase	IB: 1:5000	Jackson/Dianova 211-055-109
Kaninchen IgG	Cy3	IF: 1:2000	Dianova 111-166-045
Kaninchen IgG	Alexa488	IF: 1:1000	Mol.Probes M-10992

Kaninchen IgG	IRDye 680 LT	IB: 1:80000 – 1:1000000	LI-COR Biosciences 925-68023
Kaninchen IgG	IRDye 800 CW	IB: 1:80000 – 1:1000000	LI-COR Biosciences 925-32213

IB: Immunoblot, IF: Immunfluoreszenz, mk: monoklonal, pk: polyklonal

2.2 Methoden

Alle Methoden wurden nach Standardprotokoll der „Professur für Molekulare Onkologie solider Tumore“ durchgeführt. Etwaige Änderungen sind gekennzeichnet.

2.2.1 Kultivierung von humanen, adhärennten Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zum Desinfizieren wurde 70 %iger Alkohol verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einem relativen CO₂-Druck von 10 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % in Wachstumsmedium. Alle 2-3 Tage wurde bei den Zellen ein Medienwechsel durchgeführt, wobei das komplette Wachstumsmedium abgesaugt und ersetzt wurde. Die verwendete Menge an Wachstumsmedium richtete sich nach der Schalengröße.

Wachstumsmedium

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

10 % (V/V) Fötales Kälberserum (FCS)

1% (V/V) L-Glutamin

1 % (V/V) MEM Nicht essentielle Aminosäuren

Schalengröße	Menge an Wachstumsmedium (ml)
100 mm-Schale	10 ml
6 mm-Schale	3-5 ml
6er Well	2 ml pro Well

2.2.2 Passagieren von Zellen

Bei Erreichen einer Konfluenz von 90-100 % wurden die Zellen umgesetzt. Vor Beginn der Arbeit wurde das CMF-PBS und das Wachstumsmedium auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 1x CMF-PBS gewaschen. Anschließend wurden 2-4 ml 0,25 %ige Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben um die Zellen abzulösen. Unter dem Mikroskop wurde die erfolgte Ablösung der Zellen kontrolliert und anschließend die Enzymreaktion durch Zugabe von 5 ml Wachstumsmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Polypropylenröhrchen überführt und durch Zentrifugation 3 min bei 1000 rpm bei Raumtemperatur sedimentiert. Zuletzt wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in geeigneter Verdünnung (1:5 bis 1:20) auf neue Zellkultur-schalen ausgesät.

1x CMF-PBS

(Calcium- und Magnesium-freie Phosphat-gepufferte Saline)

140 mM NaCl
2,6 mM KCl
8 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
pH 7,2

Trypsin-EDTA-Lösung

0,5 g Trypsin
0,2 g EDTA
in 1l Kochsalzlösung gelöst

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Zur mikroskopischen Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl einer Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer unter ein Deckglas pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden mit einer zehnfachen Objektvergrößerung die Zellen im Zählkreuz ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml Medium}$$

Es wurden mindestens zwei große Quadrate aus zwei unabhängigen Bestimmungen ausgezählt und anschließend der Mittelwert gebildet.

2.2.4 Plasmidgewinnung

Für die Vervielfältigung und Aufreinigung der Plasmid-DNA wurden mit Plasmid-DNA transformierte *Escherichia coli*-Bakterienstämme eingesetzt. Die Bakterien enthielten die Plasmide pEGFP RhoA WT und pEGFP RhoC WT. Es wurde jeweils eine Kolonie der *E. coli*-Bakterien mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in ein 5 ml Polypropylenröhrchen mit LB-Medium und 25 µg/ml Kanamycin gegeben. Anschließend wurde die Vorkultur bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert, bis die Bakterien ausreichend gewachsen waren, sichtbar an einer trüben Farbe. Anschließend wurde in jeweils 120 ml LB-Medium, versetzt mit 25 µg/ml Kanamycin, eine Übernachtskultur hergestellt und diese bei Raumtemperatur bei 200 rpm geschüttelt. Durch anschließende Zentrifugation der Bakterienkultur für 15 min bei 4 °C und 5000 rpm wurden die Bakterien sedimentiert. Der klare Überstand (LB-Medium) wurde abgegossen und das Pellet mit RNase Puffer des NucleoBond® Xtra Midi DNA Präparationskit resuspendiert bis eine homogene Suspension entstand. Die *E. coli*-Bakterienstämme wurden bei -20 °C gelagert. Aus den resuspendierten Bakterien wurde nach Herstellerangaben des NucleoBond® Xtra Midi DNA Präparationskits das Plasmid isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten DNA-Plasmide erfolgte photometrisch und im 1 %igen Agarosegel. Dabei ergaben sich Konzentrationen zwischen 1,7 und 2,7 µg/µl.

LB-Medium

1 % (m/V) Trypton

0,5 % (m/V) Hefeextrakt

1 % (m/V) NaCl

pH 7,5

in demineralisiertem Wasser gelöst

2.2.5 Transiente Transfektion von Lungenkarzinomzellen

Mit Hilfe der Transfektion ist es möglich genetisch veränderte Zellen herzustellen, welche z.B. vermehrt ein rekombinantes Protein produzieren. Im Gegensatz zur stabilen

Transfektion wird bei der transienten Transfektion die DNA nicht in das Genom der Wirtszelle eingebaut und nur über einen kurzen Zeitraum exprimiert.

Für die Transfektion der Zelllinien A549 und H23 wurde das Transfektionsreagenz JetPEI DNA transfection reagent von Polyplus eingesetzt. Zu Beginn wurden jeweils 3×10^5 Zellen pro 6 cm-Schale einer jeden Zelllinie ausgesät und die Zellen am nächsten Tag bei einer Dichte von 70-80 % mit den DNA-Plasmiden pEGFP, pEGFP RhoA WT und pEGFP RhoC WT transfiziert. Hierfür wurden zwei Lösungen angesetzt. In zwei Reagiergefäße wurden jeweils 200 μ l einer sterilen 150 mM NaCl-Lösung pipettiert. Anschließend wurde dem einen Reagiergefäß die gewünschte Menge an Plasmid-DNA und dem anderen Reagiergefäß das Transfektionsreagenz hinzugefügt. Für H23-Zellen wurde 2 μ g Plasmid-DNA und 4,5 μ l Transfektionsreagenz eingesetzt und für A549-Zellen 3 μ g DNA und 12 μ l Transfektionsreagenz. Die Lösungen wurden mit einem Vortexer gemischt und nach einer Inkubationszeit von 15 min auf die Zellen getropft. Anschließend wurden die Zellen im CO₂-Inkubator bei 37 °C gelagert. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel. Nach weiteren 24 h wurde die Transfektionseffizienz unter dem Mikroskop überprüft. Unter Einsatz eines EGFP-Filters konnten die grün fluoreszierenden Zellen sichtbar gemacht und fotografiert werden. Es wurde die komplette Schale durchgemustert und ein repräsentatives Foto der transfizierten Zellen und ein Phasenkontrastbild aufgenommen. Das Bild im EGFP-Filter und das Phasenkontrastbild wurden miteinander verglichen und durch Auszählung der Gesamtzahl der Zellen und der transfizierten Zellen die Transfektionseffizienz bestimmt.

H358-Zellen wurden ebenfalls mit den DNA-Plasmiden pEGFP, pEGFP RhoA WT und pEGFP RhoC WT transient transfiziert. Für die Transfektion von H358-Zellen wurde das NanoJuice Transfektionskit von Merck Millipore verwendet, welches die zwei Transfektionsreagenzien Nano-Juice Core Transfection Reagent und Nanojuice Transfection Booster enthält. Zunächst wurden pro 6 cm-Schale 6×10^5 Zellen ausgesät und am nächsten Tag bei einer Dichte von ca. 60-70 % transfiziert. Hierzu wurden 6 μ l Nano-Juice Core Transfection Reagent und 9 μ l Nanojuice Transfection Booster, 200 μ l OptiMEM, 2 μ g der jeweiligen Plasmid-DNA und jeweils 2 μ g pcDNA3.1 mit einem Vortexer gemischt und nach 5 min Inkubationszeit auf die Zellen getropft. Anschließend wurden die Zellen im CO₂-Inkubator bei 37 °C gelagert. Nach einer Inkubation von 24 h wurde ein Medienwechsel durchgeführt und die Transfektionseffizienz wie oben beschrieben lichtmikroskopisch dokumentiert und durch Auszählung bestimmt.

2.2.6 Herstellung von Zelllysaten

Bei Herstellung der Zelllysate wiesen die Zellen eine Konfluenz von 90-100 % auf. Um eine Degradation der Proteine durch Proteasen zu verhindern, wurden die Zellen bei jedem Schritt auf Eis gelagert. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem 1 x CMF-PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 μ l (60 mm-Schale) bzw. 300-500 μ l (10 cm-Schale) NOP- oder RIPA-Lysispuffer und einem Mix aus Proteaseinhibitoren wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Schalenboden abgelöst und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde durch fünfmaliges Aufziehen mit einer Spritze mit kleiner Kanüle (orangene Injektionsnadel mit einem Kanülenaußendurchmesser von 0,5 mm) homogenisiert und anschließend bei 4 °C und 10.000 rpm 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand in ein neues vorgekühltes Reaktionsgefäß pipettiert. Es wurden 2 μ l für eine Proteinbestimmung entnommen und das übrige Lysat bei -75 °C gelagert.

1x RIPA-Puffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,0
150 mM NaCl
0,1 % (V/V) SDS
0,5 % (V/V) Natriumdesoxycholat
1 % (V/V) Triton X-100
pH 7,2

1x NOP-Puffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,0
150 mM NaCl
1 % NP40
1 mM EDTA
1 mM EGTA
pH 7,8

100x Proteaseinhibitor

240 mg PefaBloc
100 mg Trypsin –Inhibitor (Sojabohne)
10 mg Aprotinin
1 mg Leupeptin
50 mM Tris/HCl
pH 7,4

2.2.7 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA wurde erstmals von Smith et al. eingeführt (Smith et al. 1985). Bei dieser Methode bilden Proteine in alkalischer Lösung mit Cu^{2+} -Ionen einen Komplex. Die Cu^{2+} -Ionen reagieren mit Protein und werden zu Cu^+ -Ionen reduziert. Die Cu^+ -Ionen reagieren anschließend mit Bicinchoninsäure (BCA) und bilden einen violetten Farbkomplex. Anschließend kann die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden.

Von der zu bestimmenden Proteinlösung wurden 2 μl mit 18 μl destilliertem H_2O verdünnt und anschließend 180 μl eines Kupfer(II)Sulfat-BCA-Gemisches hinzugegeben, welches 50 Volumenteile der Lösung *BCA-Protein Acid Reagent A* (Thermo Fisher Scientific) und einen Volumenanteil 4 %iger Kupfer(II)Sulfat-Lösung enthält. Zudem wurde eine Kalibrierungskurve erstellt. Hierfür wurden jeweils 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12,5 μl Rinderalbuminserum (BSA) mit einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt, mit destilliertem H_2O auf ein Endvolumen von 20 μl verdünnt und anschließend ebenfalls mit 180 μl BCA-Reagenzlösung versetzt. Alle Ansätze wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Absorption der Proben mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Probe ohne Protein diente als Nullwert der Eichgrade. Um den Messfehler möglichst klein zu halten, wurden für alle Proben Doppelbestimmungen durchgeführt. Durch den Vergleich der Absorptionswerte der Proben mit denen der Kalibrierungskurve konnte die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

2.2.8 Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation können Proteininteraktionen bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde ein magnetisches System verwendet. Dieses beinhaltet ein Protein A, welches mit magnetischen Mikropartikeln beschichtet ist, und ein Primärantikörper, der das Protein A und ein Zielprotein (Antigen) bindet. Protein A stammt ursprünglich aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* und besitzt die Fähigkeit Immunglobuline an deren Fc-Region zu binden. Durch die magnetische Beschichtung des Protein A kann der Antikörper, das Antigen und seine Interaktionspartner isoliert werden und die restlichen Proteine des Proteinlysats durch mehrmaliges Waschen entfernt werden.

Wichtig ist hierbei die Verwendung von NOP-Puffer, da durch diesen Puffer vorhandene Interaktionen zwischen Proteinen nicht aufgebrochen werden.

Im ersten Schritt wurde der E-Cadherin-Antikörper an das Protein A gekoppelt. Die Inkubation erfolgte in 500 µl IP-Puffer in einem Überkopf-Rotor für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde ein Magnet eingesetzt um das magnetische Protein mitsamt seinem gebundenen Antikörper zu präzipitieren. Der Überstand wurde abgenommen und das Präzipitat 3 x mit IP-Waschpuffer gewaschen. Es wurde 500 µg Lysat und 5 µl Proteaseinhibitor zum Ansatz gegeben und die Lösung auf ein Endvolumen von 500 µl mit IP-Puffer aufgefüllt. Bei den Immunopräzipitationen mit Lysaten transfizierter Zellen wurde 1/10 eines jeden Präzipitationsansatzes als Vergleichskontrolle in ein neues Reagiergefäß pipettiert. Die Bindung des Antikörpers an das Protein erfolgte in einem Überkopf-Rotor für 2 h bei 4 °C. Anschließend wurde der Ansatz erneut unter Einsatz eines Magneten 3 x mit IP-Waschpuffer gewaschen. Zuletzt wurde das an den Magneten gebundene Präzipitat in 30 µl Protein-Probenpuffer eluiert. Die Magnetbeads wurden bei 10 000 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagiergefäß pipettiert. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese.

IP-Puffer

50 mM Tris/HCl
150 mM NaCl
0,5 % (V/V) Triton X 100
0,5 % (V/V) NP40
pH 7,6

IP-Waschpuffer

50 mM Tris/HCl
200 mM NaCl
0,5 % (V/V) Triton X 100
1 % NP40
0,1 % Natriumdeoxycholat
pH 8,0

2.2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese erfolgte nach dem diskontinuierlichen Lämmli-System. Bei diesem System bilden die Proteine mit SDS negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Ladungs- zu Masse-Verhältnis, die sich im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht auftrennen. Es wurden Trenngele, mit einem Acrylamidgehalt von 7,5 %, 10 % und 12,5 % eingesetzt. Nach Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (N^c,N^c,N^c,N^c-Tetramethylethylendiamin) polymerisierten die Gele zu einem quervernetzten Polyacrylamid-Gel. Die Zusammensetzung für jeweils zwei Trenn- und Sammelgele kann aus der folgenden Tabelle entnommen werden:

	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5 %	Sammelgel
30 % Acrylamid	2 ml	2,6 ml	3,25 ml	0,38 ml
2 % Bisacrylamid	0,8 ml	1 ml	1,2 ml	0,15 ml
3 M Tris pH 8,8	1 ml	1 ml	1 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	-	-	0,38 ml
10 % SDS	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml	0,03 ml
60 % Saccharose	-	-	-	0,75 ml
H ₂ O dest.	4,1 ml	3,2 ml	2,45 ml	1,3 ml
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl	4 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	40 µl

Im ersten Schritt wurde das Trenngel gegossen und mit H₂O-gesättigtem Isobuthanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte über Nacht. Anschließend wurde das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet und ein Kamm (10, 12 oder 14 Taschen) eingesetzt. Die Proben wurden mit mindestens 1/5 des Gesamtvolumens mit Protein-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer mit Laufpuffer gefüllten Gelelektrophoresekammer bei einer konstanten Spannung von 100 V.

1x SDS-Laufpuffer

50 mM Tris
0,5 M Glyzin
0,1 % (m/V) SDS

5x SDS-Probenpuffer

200 mM Tris/HCl pH 8,8
5 mM EDTA
1 M Saccharose
0,1 % (m/V) Bromphenolblau
2 % (m/V) SDS

2.2.10 Coomassie-Färbung

Nachdem die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, erfolgte eine Färbung des Trenngels in Coomassie-Färbelösung um eine Degradation der Proteine auszuschließen. Das Gel wurde mit 100 ml Coomassie-Färbelösung überschichtet und über Nacht bei leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung entfärbt bis die blauen Banden deutlich sichtbar wurden.

Coomassie-Färbelösung

10 % (V/V) Essigsäure
25 % (V/V) Isopropanol
0,025 % (m/V) Coomassie Brilliant Blue R
in dest. H₂O

Coomassie-Entfärbelösung

10 % (V/V) Eisessig
12,5 % (V/V) Isopropanol
in dest. H₂O

2.2.11 Immunoblotting

Beim Immunoblotting werden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine mittels eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Tankblot wurde nach folgendem Schema aufgebaut:

Schlitten - Schwämme - 2x Filterpapier – SDS-Gel-Nitrocellulosemembran - 2x Filterpapier - Schwämme - Schlitten

Der zusammengebaute Tankblot wurde anschließend in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer gestellt. Für den Transfer der Proteine wurden je nach Acrylamidgehalt des Gels und Molekulargröße des nachzuweisenden Proteins unterschiedliche Zeiten eingesetzt. Bei einem Acrylamidgehalt des Trenngels von 7,5 % und 10 % erfolgte der Transfer für 3 h und 60 V und bei Gelen mit einem Acrylamidgehalt von 15 % für 3 h bei einer Spannung von 70 V. Die Stromstärke betrug bei jedem Blotting konstant 125 mA.

Transferpuffer

25 mM Tris/HCl
1,5 % (m/V) Glyzin
0,1 % (m/V) SDS
20 % (V/V) Methanol

2.2.12 Ponceaurot-Färbung

Im Anschluss an das Immunoblotting wurde die Nitrocellulosemembran kurz in H₂O gewaschen und für 1-3 min in Ponceaurot inkubiert. Die Entfärbung erfolgte erneut in H₂O, bis die Banden gut sichtbar wurden. Im Anschluss wurde die Membran in 5 % Milchpulver-Lösung in 1 x TBS oder in 3 %iger BSA Lösung in 1 x TBS bei Raumtemperatur für 1 h bei leichtem Schütteln inkubiert um unspezifische Bindungen zu blockieren und die Membran wieder vollständig zu entfärben.

Ponceau S-Lösung

0,2 % (m/V) Ponceau S
3 % (m/V) Trichloressigsäure

2.2.13 Immunfärbung

Um ausgewählte an die Nitrocellulose-Membran gebundenen Proteine nachzuweisen und sichtbar zu machen, werden sie an Antikörper gebunden. Hierzu werden ein primärer und ein sekundärer Antikörper eingesetzt. Der primäre Antikörper richtet sich gegen das Zielprotein und der sekundäre Antikörper bindet den Erstantikörper. Die Sekundärantikörper waren mit Peroxidase HRP (*horseradish peroxidase*) oder mit Fluoreszenzfarbstoffen (IRDye) gekoppelt.

Im ersten Schritt wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper gelöst in 1 x TBS-T bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, ebenfalls gelöst in 1 x TBS-T, bei Raumtemperatur für 1 h. Vor und nach der Inkubation der Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran jeweils zweimal mit 1 x TBS und einmal mit TBS-T für jeweils 10 min gewaschen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einer Wippe.

Die Detektion erfolgte je nach Art des Sekundärantikörpers in unterschiedlichen Systemen.

2.2.14 Proteindetektion mittels Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenz wurde zum Nachweis von Proteinen eingesetzt, wenn die gebundenen Sekundärantikörper an HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt waren. Die Peroxidase HRP katalysiert die Oxidation von Luminol. Diese Reaktion geht mit der Emission von Licht mit der Wellenlänge von 428 nm einher. Um das emittierte Licht zu verstärken, wurden zwei Reagenzien eingesetzt. Die ECL-Reagenzien, der *Luminol-Enhancer* und die *Peroxidase-Solution*, wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und der Westernblot mit dieser Lösung überschichtet und in einer lichtundurchlässigen Kammer für 2 min inkubiert. Die Detektion des emittierten Lichtes erfolgte digital über einen CCD-Sensor im Fusion SL von Vilber.

2.2.15 Proteindetektion mittels Nah-Infrarot-Lumineszenz

Dieses Verfahren setzt die Nah-Infrarot-Fluoreszenz (NIF) zur Detektion von Proteinen ein. Wurden für die Inkubation des Westernblots IRDye-Sekundärantikörper verwendet, erfolgte der Nachweis mittels des LI-COR Odyssey Sa. Die IRDye-Sekundärantikörper sind an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Dieser Farbstoff wird durch einen Laser der entsprechenden Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht detektiert. Durch die Detektion des emittierten Lichtes im LI-COR Odyssey Sa kann eine quantitative Erfassung der Proteinmengen erfolgen. Ein Substrat wird für dieses Verfahren nicht benötigt. Die Verdünnung der Sekundärantikörper erfolgte in 1x TBS.

2.2.16 Entwicklung mittels Alkalischer Phosphatase

Bei dieser Nachweisreaktion spaltet die alkalische Phosphatase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, ein Phosphat des 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphats ab (BCIP), welches in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird.

Der Blot wurde zunächst zweimal für 10 min mit 1x TBS gewaschen und ein drittes Mal für 10 min mit alkalischem Waschpuffer unter kontinuierlichem Schütteln. Anschließend wurde der Blot mit einer Lösung von einem Teil BCIP und einem Teil NBT in 100 Teilen AP-Puffer für einige Minuten überschichtet und es erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation bis Banden auf dem Blot sichtbar wurden. Wenn die gewünschte Bandenintensität erreicht war, wurde die Reaktion mittels H_2O gestoppt.

AP-Puffer

50 mM Tris/HCl pH 9,4
50 mM $MgCl_2$

NBT-Lösung

1% (m/V) NBT (4-Nitroblau Tetrazolium Chlorid) in H_2O

BCIP-Lösung

1% (m/V) BCIP (5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat) in H_2O
50 mM $MgCl_2$

2.2.17 Immunfluoreszenzfärbung

Mit der Immunfluoreszenzfärbung kann die Lokalisation einzelner Proteine in der Zelle dargestellt werden. Zunächst wird ein Primärantikörper benötigt, der das Zielprotein (Antigen) erkennt und bindet. Durch einen zusätzlich eingesetzten Sekundärantikörper, welcher selbst einen fluoreszierenden Farbstoff gebunden hat und gegen den Primärantikörper gerichtet ist, kann die Lokalisation der Antigene sichtbar gemacht werden. Hierzu wird ein Lichtmikroskop (IX 70 Olympus) eingesetzt und der fluoreszierende Farbstoff mit einem geeigneten Filter sichtbar gemacht.

Im ersten Schritt wurden Zellen auf Deckgläser in einem 6er Well ausgesät. Nach Erhalten einer Konfluenz von 100 % wurden die Zellen mit Methanol/Aceton oder 4 % PFA für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit 1x CMF-PBS. Die Deckgläschen wurden nun mit 3 % BSA in 1x TBS für 1 h überschichtet um unspezifische Bindungen zu blockieren. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 1 % BSA in TBS für 2 h in einer feuchten Kammer.

Anschließend wurde ein Zweitantikörper eingesetzt, der an die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 oder Alexa 488 gekoppelt war. Um die Zellkerne anzufärben wurde der Farbstoff DAPI (DAPI von Sigma Bestellnummer: D-9564) eingesetzt. Die Antikörper wurden in 1 % BSA in TBS verdünnt und die Deckgläschen mit dem Sekundärantikörper für 2 h in einer abgedunkelten feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit 1x CMF-PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und die Deckgläser auf einen Objektträger mit einem Tropfen Elvanol fixiert. Jetzt konnte mittels eines Lichtmikroskops die Lokalisation der einzelnen Proteine festgestellt und dokumentiert werden.

Elvanol-Lösung in CMF-PBS

15 % (V/V) Mowiol 4-88
0,1 % (V/V) Natriumazid
30 % Glycerin

2.1.18 Densitometrische Auswertung

Jede Versuchsreihe wurde, sofern nicht anders angegeben, dreimal durchgeführt (n=3). Einige Immunoblots wurden zur quantitativen Analyse densitometrisch ausgewertet. Hierfür diente die Software Image Studio Lite Version 5.0.21. Von den Daten der densitometrischen Auswertung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - x_{\text{mittel}})^2}{n-1}}$$

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Proteingehaltes von Cadherinen und Cateninen in Lungenkarzinomzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien entstammen ausnahmslos dem humanen Lungenkarzinom. Von den neun untersuchten Lungenkarzinomzelllinien sind sechs dem Gewebe eines Adenokarzinoms (HTB-55, H2122, H23, A427, A549 und Colo 699) zuzuordnen, die Zelllinie H358 entstammt bronchoalveolärem Gewebe und die Zelllinie SCLC-21H und H1688 sind dem Gewebe des kleinzelligen Bronchialkarzinoms zugehörig.

Cadherine sind die Hauptbestandteile der Adhäsionskontakte (*adherens junctions*) und bilden in Assoziation mit Cateninen und dem Zytoskelett funktionsfähige Zell-Zell-Kontakte aus. Um eine Charakterisierung des E-Cadherin-Catenin-Adhäsionskomplexes vorzunehmen, wurden im ersten Schritt dieser Arbeit die einzelnen Lungenkarzinomzelllinien auf Vorhandensein von E-Cadherin und verschiedener Catenine untersucht. Zudem weisen tumoröse Zellen je nach Entwicklungsstufe, Phänotyp und Migrationspotential unterschiedliche Cadherin-Expressionsmuster auf. Vor diesem Hintergrund wurde neben dem „klassischen“ epithelialen Adhäsionsprotein E-Cadherin ebenfalls der Proteingehalt von N-Cadherin, P-Cadherin und Cadherin-11 analysiert.

3.1.1 Analyse des Proteingehaltes von Cadherinen

Zunächst wurden die Lungenkarzinomzelllinien HTB-55, A549, A427, H358, H23, H1688, H2122, Colo 699 und SCLC-21H auf Vorhandensein der Proteine E-Cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin und Cadherin-11 mittels Immunoblot analysiert (Abbildung 1).

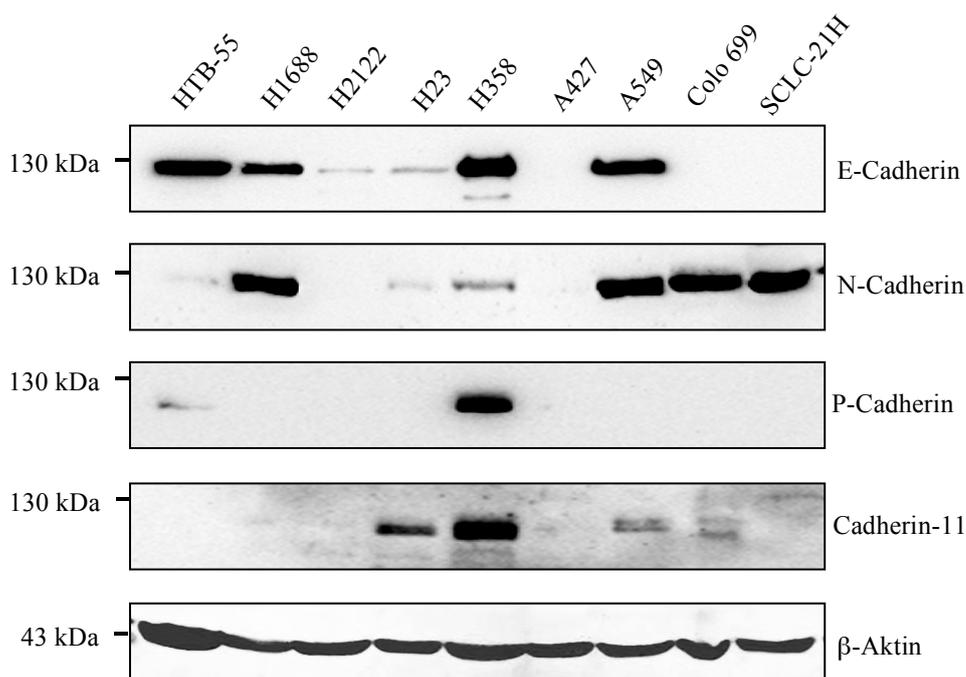


Abbildung 1: Proteingehalt von E-Cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin und Cadherin-11 in humanen Lungenkarzinomzellen. Es wurden pro Spur jeweils 50 µg Protein im 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die einzelnen Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot nachgewiesen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels Chemilumineszenzverfahren. Der Nachweis von β-Aktin diente als Beladungskontrolle. Die Detektion von β-Aktin erfolgte mittels alkalischer Phosphatase durch ein Farbreagenz. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=2).

E-Cadherin, in der Literatur beschrieben als ca. 120 kDa großes Protein, ist bei einer Molekulargröße von ca. 120-130 kDa nachweisbar. Vier (HTB-55, H1688, H358 und A549) der neun analysierten Lungenkarzinomzelllinien weisen hohe Proteinkonzentrationen von E-Cadherin auf. In den Zelllinien H23 und H2122 ließen sich nur geringe Mengen an E-Cadherin nachweisen und die Zelllinien A427, Colo 699 und SCLC-21H exprimieren kein E-Cadherin. Das neuronale N-Cadherin weist im Immunoblot eine Molekulargröße von 130 kDa auf. Den höchsten Proteingehalt an N-Cadherin weisen die E-Cadherin negativen Zelllinien Colo 699 und SCLC-21H und die Zelllinien H1688 und A549 auf. In den Zelllinien H358 und H23 ließen sich nur sehr geringe Mengen an N-Cadherin detektieren. Das 120 kDa schwere Protein P-Cadherin ließ sich nur in zwei Lungenkarzinomzelllinien nachweisen und ist dabei in hoher Konzentration in H358-Zellen und in geringer Konzentration in HTB-55-Zellen vorhanden. Das zuletzt analysierte mesenchymale Cadherin-11, welches im Immunoblot eine Molekulargröße von 110 kDa aufweist, konnte in der größten Konzentration in H358-Zellen, in mittlerer

Konzentration in H23-Zellen und in sehr geringer Konzentration in A549-Zellen und Colo 699-Zellen nachgewiesen werden. Bei Betrachtung aller Immunoblots fällt auf, dass sich in den bronchoalveolären H358-Zellen als einzige Zelllinie jedes analysierte Cadherin nachweisen ließ und die Zelllinie A427 keines der untersuchten Cadherine aufweist. Insgesamt zeigten die analysierten Lungenkarzinomzelllinien große Unterschiede in der Expression der einzelnen Cadherine.

3.1.2 Analyse des Proteingehaltes von Cateninen

Catenine sind wichtige Interaktionspartner der Cadherine und für die Ausbildung funktionsfähiger Adhäsionskomplexe unerlässlich. Daher sollten im nächsten Schritt die neun Lungenkarzinomzelllinien auf Vorhandensein von α -Catenin, β -Catenin, γ -Catenin und p120ctn analysiert werden. Hierzu wurden die in Abbildung 2 gezeigten Immunoblots durchgeführt.

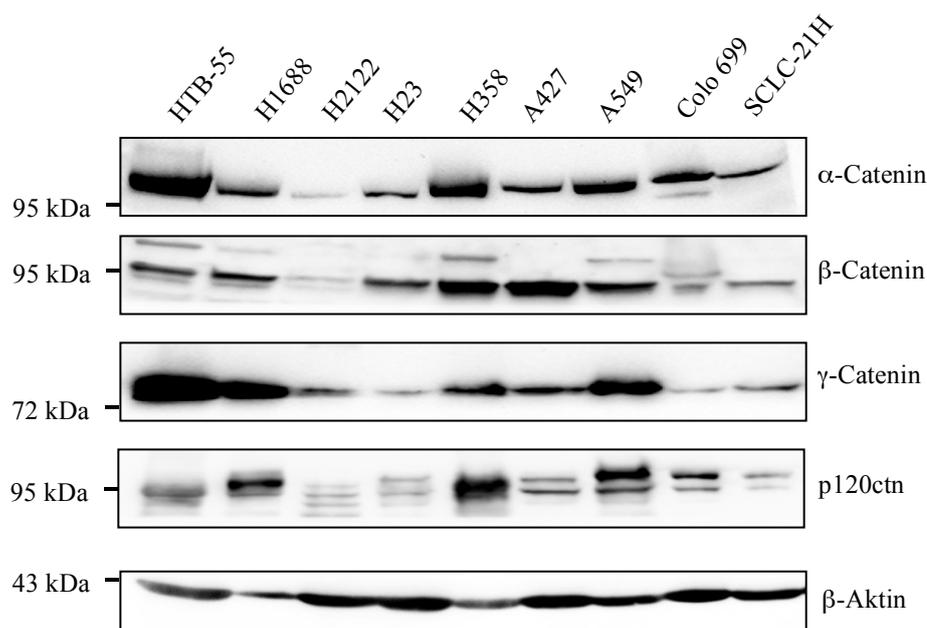


Abbildung 2: Proteingehalt von α -Catenin, β -Catenin, γ -Catenin und p120ctn in Lungenkarzinomzellen. Zur Analyse des Proteingehaltes wurden jeweils 50 μ g Protein eingesetzt und im 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch den Einsatz spezifischer Antikörper und die Detektion mittels Chemilumineszenzverfahren. β -Aktin diente als Beladungskontrolle. Dargestellt sind repräsentative Blots (n=2).

Bei Betrachtung der Immunoblots fällt auf, dass sich in allen Lungenkarzinomzelllinien jedes analysierte Catenin nachweisen ließ. Hierbei ließ sich α -Catenin bei einer Mole-

kulargröße von 102 kDa, β -Catenin bei einer Molekulargröße von 94 kDa und γ -Catenin bei einer Molekulargröße von 86 kDa detektieren. Isoformen des p120ctn sind bei einer Markerbande von 95 kDa sichtbar. Es fällt auf, dass der Proteingehalt von α -, β - und γ -Catenin in den analysierten Zelllinien mit dem Proteingehalt von E-Cadherin korreliert. Die höchsten Konzentrationen von α -, β - und γ -Catenin ließen sich in den Zelllinien HTB-55, H358 und A549 nachweisen, welche ebenfalls hohe Konzentrationen von E-Cadherin aufweisen. Eine Ausnahme stellt jedoch die E-Cadherin negative Zelllinie A427 dar, welche ebenfalls eine hohe Konzentration von α -, β - und γ -Catenin aufweist. In den Zelllinien H2122, H23, Colo 699 und SCLC-21H-Zellen ließen sich vergleichsweise geringere Proteinmengen aller Catenine detektieren.

Vom Protein p120ctn existieren verschiedene Isoformen, welche durch die Verwendung unterschiedlicher Startkodons und durch alternatives Spleißen gebildet werden. Daher können in einer Zelle mehrere Isoformen auf Proteinebene nachweisbar sein. Das Molekulargewicht der Isoformen liegt zwischen 80 – 120 kDa. In den Zelllinien H23, A427, A549, Colo 699 und SCLC-21H ließen sich zwei Isoformen mit einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa und ca. 100 kDa nachweisen. In den Zelllinien HTB-55, H1688 und H358 konnte eine Isoform des p120ctn mit einem Molekulargewicht von 95 kDa nachgewiesen werden. Die höchsten Proteinmengen von p120ctn wurden in den Zelllinien H358, A549 und H1688 detektiert.

3.2 Nachweis des E-Cadherin-Catenin-Komplexes in A549, H358, HTB-55 und H23-Zellen

Im Anschluss an den Nachweis des Gesamtgehaltes der Cadherine und Catenine in verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien sollte nun untersucht werden, ob das epitheliale E-Cadherin mit den Cateninen α -Catenin, β -Catenin und p120ctn assoziiert ist und als Komplex in der Zelle vorliegt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden aus den bisher neun analysierten Lungenkarzinomzelllinien anhand der Expressionsmuster von E-Cadherin, α -Catenin, β -Catenin und p120ctn vier Zelllinien zur weiteren Analyse ausgewählt und mittels Immunpräzipitation auf Vorhandensein des E-Cadherin-Catenin-Komplexes untersucht. Besonders geeignet erschienen die Lungenkarzinomzellen A549, H358 und HTB-55, welche hohe Konzentrationen an E-Cadherin, α -, β - Ca-

tenin und p120ctn aufwiesen sowie die Zelllinie H23 mit geringerer Proteinmenge an E-Cadherin.

Um eine Interaktion zwischen E-Cadherin und Cateninen nachzuweisen, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Mittels eines E-Cadherin-Antikörpers wurden aus NOP-Zelllysaten der Zelllinien A549, H358, HTB-55 und H23 E-Cadherin und an E-Cadherin direkt oder indirekt gebundene Proteine kopräzipitiert. Wie in Abbildung 3 dargestellt, konnte in allen vier Zelllinien E-Cadherin erfolgreich präzipitiert werden und assoziiertes α -Catenin, β -Catenin und p120ctn im Westernblot nachgewiesen werden.

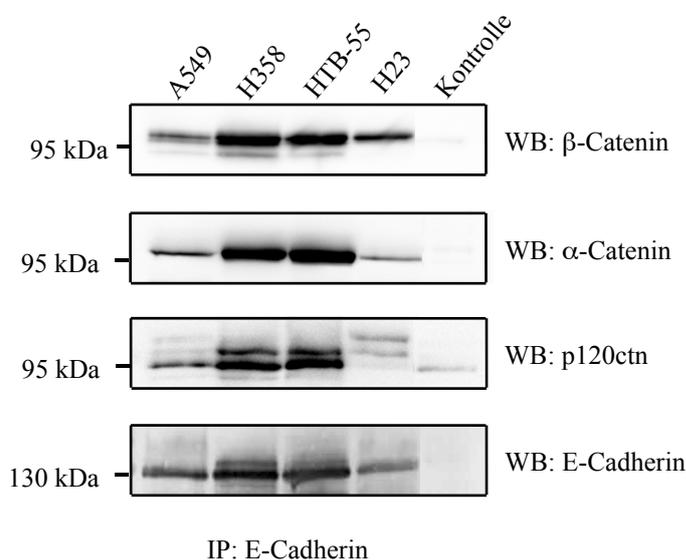


Abbildung 3: Nachweis des E-Cadherin-Catenin-Komplexes in A549, H358, HTB55 und H23-Zellen. Um Interaktionen zwischen E-Cadherin und Cateninen nachzuweisen wurde eine Immunpräzipitation mit einem E-Cadherin-Antikörper durchgeführt. Hierzu wurde aus jeweils 500 μ g NOP-Zelllysaten E-Cadherin präzipitiert und anschließend im Westernblot kopräzipitiertes α -Catenin, β -Catenin und p120ctn nachgewiesen. Zur Detektion der Catenine wurde das ECL-Chemilumineszenzverfahren eingesetzt. Die Detektion von E-Cadherin erfolgte mittels alkalischer Phosphatase durch ein Farbreagenz. Zur Kontrolle wurden 500 μ g A549-Lysat ohne präzipitierenden Antikörper eingesetzt und alle Arbeitsschritte der Immunpräzipitation in gleicher Weise durchgeführt. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=3).

In H358- und HTB-55-Lysaten ließ sich die größte Menge an E-Cadherin präzipitieren und gebundenes α -Catenin, β -Catenin und p120ctn nachweisen. In A549-Zellen ließ sich ebenfalls eine hohe Menge E-Cadherin präzipitieren und α -Catenin, β -Catenin und p120ctn kopräzipitieren. In H23-Zellen ließ sich analog zu der geringen endogenen Pro-

teingesamtmenge nur wenig E-Cadherin, α -Catenin, β -Catenin und p120ctn nachweisen.

P120ctn bindet an die N-terminale juxtamembranäre Domäne von E-Cadherin. Die Abbildung 3 zeigt, dass in den einzelnen analysierten Zelllinien jeweils unterschiedliche Isoformen des p120ctn mit E-Cadherin assoziiert vorliegen. In H358 und HTB-55 ließen sich jeweils hohe Mengen an p120ctn bei einem Molekulargewicht von 92 kDa detektieren, welche der Isoform 3 entsprechen könnte. In den Zelllinien HTB-55, H358 und H23 konnten zwei weitere komplexgebundene Isoformen nachgewiesen werden, welche sich im RIPA-Gesamtlysate (Abbildung 2) nicht nachweisen ließen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Immunopräzipitationen mit der 10fachen Menge des Zelllysates bezogen auf die Westernblots in Abbildung 2 durchgeführt wurden und somit mehr Isoformen nachgewiesen werden konnten. Bei genauerer Betrachtung der Zelllinie A549 fällt auf, dass sich im Gesamtlysate zwei endogene Isoformen des p120ctn nachweisen ließen, jedoch in der durchgeführten Immunopräzipitation nur eine Isoform bei 93 kDa entsprechend der Isoform 3 detektiert wurde. Somit liegt in A549-Zellen vermutlich nur die Isoform 3 komplexgebunden vor. Die H23-Zellen exprimieren endogen zwei Isoformen des p120ctn. In der Koimmunopräzipitation fällt auf, dass in H23-Zellen die größte Isoform mit etwa 100 kDa aller analysierten Zelllinien komplexgebunden vorliegt.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass in allen analysierten Zelllinien der E-Cadherin-Catenin-Komplex in unterschiedlicher Menge vorliegt. Zudem ließ sich zeigen, dass in A549, H358, HTB-55 und H23-Zellen jeweils verschiedene Isoformen des p120ctn komplexgebunden vorliegen.

3.3 Lokalisation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes in H358, H23 und A549-Zellen

Nachdem mittels Immunopräzipitation gezeigt werden konnte, dass E-Cadherin mit α -Catenin, β -Catenin und p120ctn interagiert und somit als E-Cadherin-Catenin-Komplex vorliegt, sollte anschließend die Lokalisation des Komplexes mittels Immunfluoreszenzanalysen in H358, H23 und A549-Zellen untersucht werden. Abbildung 4, 5 und 6 zeigen jeweils die Immunfluoreszenzanalysen der Proteine E-Cadherin, β -Catenin, α -

Catenin und p120ctn in den Zelllinien H358, H23 und A549. E-Cadherin war in allen Zellen in grün und α -Catenin, β -Catenin, sowie p120ctn in rot dargestellt.

In der Immunfluoreszenzfärbung der H358-Zellen (Abbildung 4) ließ sich beobachten, dass E-Cadherin, β -Catenin, α -Catenin und p120ctn sowohl im Zytosol als auch membranständig vorkommen. Die höchste Konzentration der Proteine zeigte sich im Bereich der Zell-Zell-Kontakte benachbarter Zellen (gelber Pfeil). In der Überlagerung von E-Cadherin und β -Catenin stellte sich eine Kolokalisation der beiden Proteine an der Membran in der Region der Zell-Zell-Kontakte als gelbe scharfe Linie dar (roter Pfeil). Die Überlagerung von E-Cadherin und α -Catenin sowie E-Cadherin und p120ctn zeigte ebenfalls eine Kolokalisation der beiden Proteine im Bereich der Membranen in Kontakt tretender Zellen (roter Pfeil).

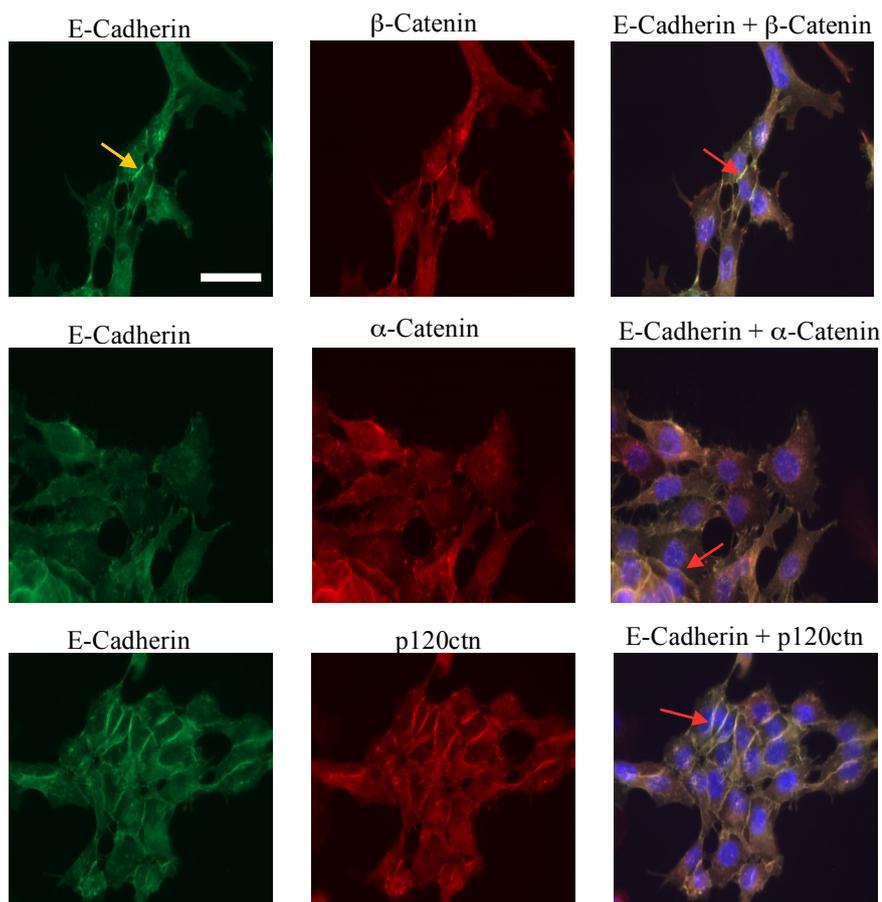


Abbildung 4: Lokalisation der Proteine E-Cadherin, α -Catenin, β -Catenin und p120ctn in H358-Zellen. Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die einzelnen Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern angefärbt und immunhistochemisch detektiert. Die rechte Spalte zeigt die Überlage-

rung von E-Cadherin mit α -Catenin, β -Catenin oder p120ctn. Die Zellkerne wurden mit dem blauen Farbstoff DAPI angefärbt. Der weiße Balken entspricht 50 μm .

Die Immunfluoreszenzanalysen der H23-Zellen sind in Abbildung 5 dargestellt. E-Cadherin ließ sich hierbei in unterschiedlicher Verteilung sowohl perinukleär als auch membranständig nachweisen, wobei die höchste Konzentration im Bereich der Zell-Zell-Kontakte sichtbar wurde (gelber Pfeil). Die Catenine zeigten eine ähnliche Anfärbung wie E-Cadherin. In den Überlagerungen der Immunfluoreszenzbilder, dargestellt in der rechten Spalte, ist die als gelbes Signal sichtbare Kolo-kalisation von E-Cadherin mit β -Catenin, α -Catenin sowie p120ctn erkennbar (rote Pfeile). Obwohl die H23-Zellen im Proteingehalt nur geringe Mengen an E-Cadherin und Cateninen aufweisen und im Vergleich zu den anderen Zelllinien eine geringe Menge des E-Cadherin-Catenin-Komplexes präzipitiert werden konnte, zeigen die Immunfluoreszenzaufnahmen eine gut sichtbare Anfärbung aller analysierten Proteine und eine Kolo-kalisation von E-Cadherin und assoziierter Catenine an der Membran benachbarter Zellen (roter Pfeil). In Zellen, welche nicht miteinander in Kontakt treten, sind die Proteine vorwiegend intrazellulär im Bereich des Nukleus darstellbar. Dies könnte jedoch auch ein Fixierungsartefakt sein.

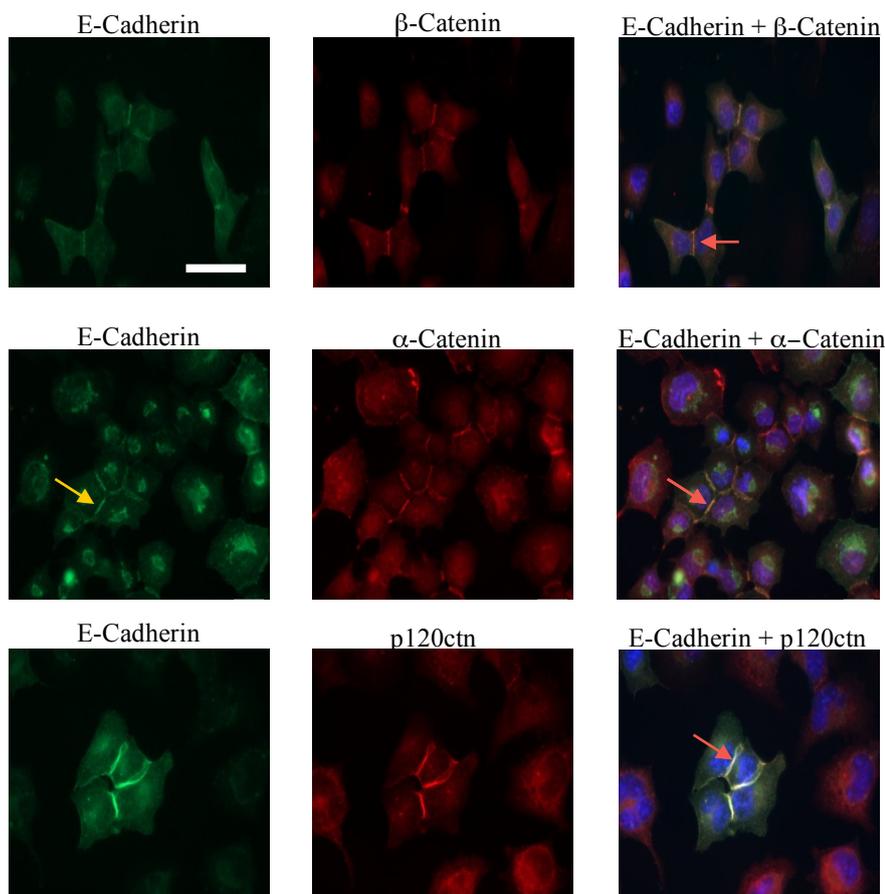


Abbildung 5: Lokalisation der Proteine E-Cadherin, β -Catenin, α -Catenin und p120ctn in H23-Zellen. Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierzu wurden H23-Zellen mit Methanol/Aceton fixiert und anschließend unter Einsatz monoklonaler Antikörper die Proteine E-Cadherin, β -Catenin, α -Catenin und p120ctn nachgewiesen. Um den Zellkern anzufärben wurde der blaue Farbstoff DAPI eingesetzt. Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung der Proteine und es ist eine Kolokalisation mit E-Cadherin und α -Catenin, bzw. E-Cadherin und β -Catenin und E-Cadherin und p120ctn zu sehen (rote Pfeile). Der weiße Balken entspricht 50 μm .

In den Immunfluoreszenzaufnahmen der Zelllinie A549, welche in Abbildung 6 dargestellt sind, ließ sich E-Cadherin deutlich membranständig im Bereich benachbarter Zellen darstellen (gelber Pfeil). Analog zu E-Cadherin wiesen β -Catenin, α -Catenin und p120ctn ebenfalls eine vorwiegend membranständige Lokalisation auf und in den Überlagerungsbildern war eine deutliche Kolokalisation von E-Cadherin und der assoziierten Catenine sichtbar, erkennbar an dem gelben Signal (rote Pfeile).

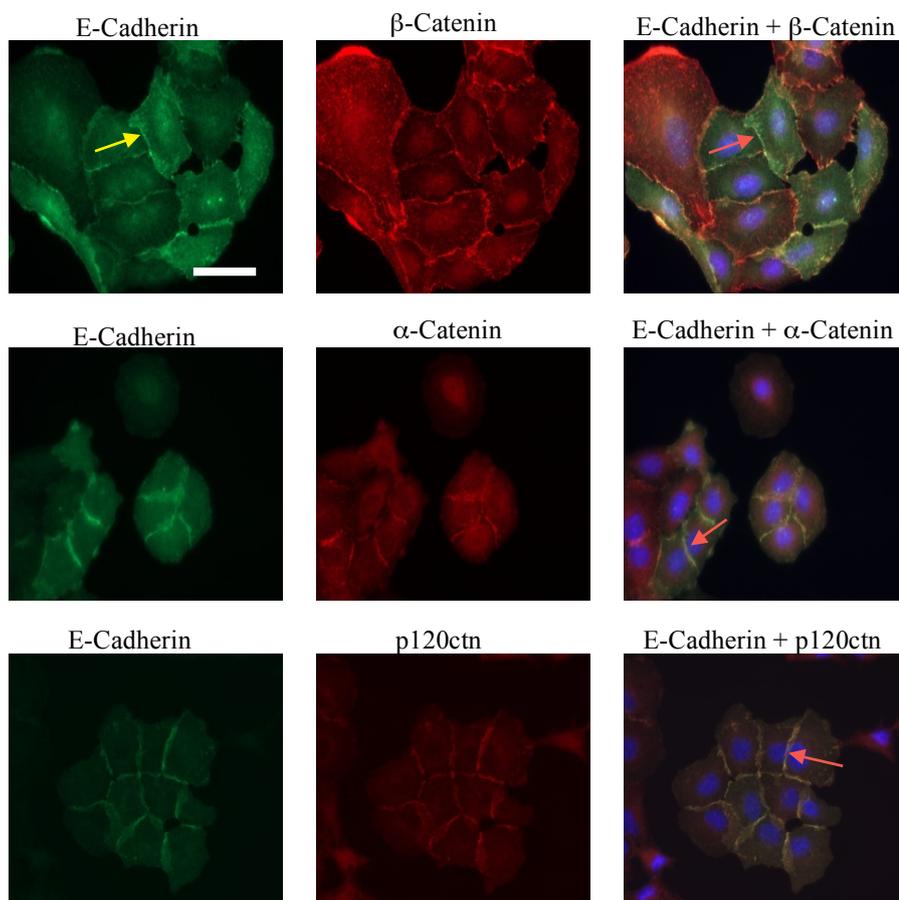


Abbildung 6: Lokalisation der Proteine E-Cadherin, β -Catenin und α -Catenin in A549-Zellen. Zur Bestimmung der Lokalisation wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung der Proteine und es ist deutlich eine Kolokalisation mit E-Cadherin und β -Catenin, bzw. E-Cadherin und α -Catenin und E-Cadherin und p120ctn erkennbar. Der weiße Balken entspricht 50 μ m.

Insgesamt konnte in allen analysierten Zelllinien eine Kolokalisation von E-Cadherin, β -Catenin, α -Catenin und p120ctn an der Membran benachbarter Zellen im Bereich der Zell-Zell-Kontakte dargestellt werden. Hierbei zeigte sich von den analysierten Zelllinien die deutlichste membranständige Konzentration von E-Cadherin und der assoziierten Catenine im Bereich der Zell-Zellkontakte in A549-Zellen.

3.4 Einfluss von RhoA und RhoC auf den E-Cadherin-Adhäsionskomplex

Rho-GTPasen und E-Cadherin nehmen während der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und der Migration einer Tumorzelle wichtige Funktionen ein. RhoA reguliert dabei die Umstrukturierung des Zytoskeletts und somit die dynamische Aktivität der Tumorzelle als auch die Neuformation der Adhäsionskontakte. Auch RhoC kann die migratorische Aktivität einer Tumorzelle steigern. Um den Einfluss von RhoC und RhoA auf Proteine des E-Cadherin-Catenin-Komplexes zu untersuchen, wurden weitere Versuche durchgeführt und Lungenkarzinomzellen mit den DNA-Plasmiden pEGFP/RhoA WT und pEGFP/RhoC WT, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, transfiziert.

3.4.1 Analyse des Proteingehaltes von RhoA und RhoC in Lungenkarzinomzellen

Zunächst wurde der endogene Proteingehalt von RhoA und RhoC in verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien mittels Immunoblot in Zusammenarbeit mit Stephanie Wirth untersucht. Der Proteingehalt von RhoA und RhoC ist in Abbildung 7 dargestellt. Es ließ sich in allen analysierten Lungenkarzinomzellen RhoA und RhoC in unterschiedlichen Mengen nachweisen. Bandensignale von RhoC ließen sich im Immunoblot auf einer Höhe von 23 kDa detektieren und RhoA stellte sich bei einer Molekulargröße von 21 kDa dar. Der eingesetzte RhoC-Antikörper wies eine geringe Spezifität auf und neben dem Bandensignal für RhoC wurden weitere Banden sichtbar. Daher wurde zur Identifizierung der spezifischen Bande von RhoC Lysat der Zelllinie HEK, welche RhoC transient exprimiert, eingesetzt. Den höchsten Proteingehalt sowohl für RhoC wiesen die Zelllinien H358 und H1688 auf. Ebenfalls hohe Konzentrationen ließen sich in A427, A549, H23 und HCC44-Zellen detektieren, gefolgt von den geringsten nachweisbaren Konzentrationen in HTB-55, Colo 699 und SCLC-21H-Zellen. Für RhoA ließen sich besonders starke Bandensignale in H1688, Colo 699 und H358 nachweisen. Auch die Zelllinien A549, A427, HCC44 und HTB-55 zeigten gut nachweisbare Proteinmengen von RhoA. In den Zelllinien H23 und SCLC-21H wurden die geringsten Proteinmengen an RhoA nachgewiesen.

Insgesamt weisen alle analysierten Zelllinien einen hohen endogenen Proteingehalt an RhoA, RhoC oder beider Rho-GTPasen auf.

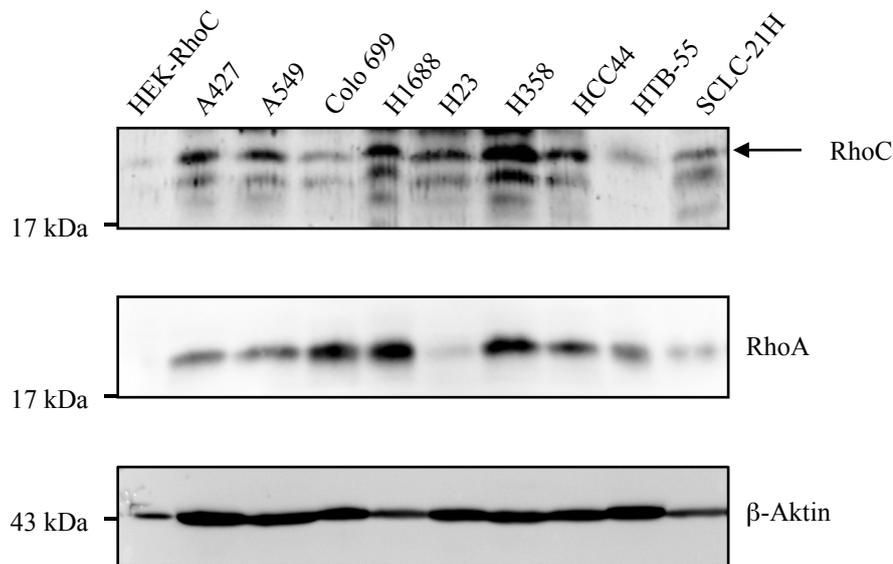


Abbildung 7: Proteingehalt von RhoC und RhoA in Lungenkarzinomzelllinien. Es wurden 50 μg Protein der Lungenkarzinomzellen im 12,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Immublot mittels spezifischer Antikörper und die Detektion der Proteine im Chemilumineszenzverfahren. Als Positivkontrolle für RhoC wurde in der ersten Spur 10 μg HEK RhoC aufgetragen. β -Aktin diente als Beladungskontrolle. Dargestellt sind repräsentative Blots ($n=2$).

3.4.2 Einfluss von RhoA und RhoC auf den Proteingehalt von E-Cadherin und β -Catenin in H358-Zellen

H358-Zellen wurden mit den Plasmiden pEGFP, pEGFP/RhoA WT und pEGFP/RhoC WT transient transfiziert. Die durch Auszählung der grün fluoreszierten Zellen ermittelte Transfektionseffizienz der H358-Zellen war in allen Versuchen etwa vergleichbar und betrug ca. 50 % für pEGFP transfizierte und ca. 25 % für pEGFP/RhoA WT und ca. 25 % für pEGFP/RhoC WT transfizierte H358-Zellen. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Proteinmenge im Immunoblot analysiert. Die Abbildung 8A zeigt Bandensignale der Fusionsproteine von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC auf einer Höhe von 55 kDa. In H358 EGFP Zellen ist das transfizierte EGFP mit einer Molekulargröße von 30 kDa detektierbar. Zusätzlich zu dem Bandensignal des EGFP-Rho wurde EGFP auch in den EGFP-RhoA und EGFP-RhoC transfizierten H358-Zellen nachgewiesen, welches vermutlich ein Abbauprodukt des EGFP-Rho darstellt. Insgesamt ist EGFP als Doppelbande nachweisbar, wobei eine Bande vermutlich ein Degradationsprodukt darstellt.

In Abbildung 8B ist der Nachweis der Proteinmenge von E-Cadherin und β -Catenin in H358 EGFP, H358 EGFP-RhoA und H358 EGFP-RhoC Zellen dargestellt. Die Grafik stellt die quantitative, densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten dar. Aus der Grafik ist ersichtlich, dass in EGFP-RhoA transfizierten Zellen für E-Cadherin eine 0,91fache ($\pm 0,11$ SD) und für β -Catenin eine 1,24fache ($\pm 0,28$ SD) Menge im Vergleich mit der EGFP transfizierten Kontrolle detektiert wurde. In den EGFP-RhoC transfizierten Zellen wurde für E-Cadherin die 1,02fache ($\pm 0,18$ SD) Menge im Vergleich zur Kontrolle und für β -Catenin die 1,22fache ($\pm 0,17$ SD) Menge nachgewiesen. Insgesamt zeigt die Analyse des Proteingehaltes von E-Cadherin für alle transfizierten H358-Zellen ähnliche Proteinmengen.

Die Überexpression von RhoA und RhoC hat somit keinen Einfluss auf den Gesamtgehalt von E-Cadherin in H358-Zellen. Für β -Catenin konnte eine minimale Steigerung des Proteingehaltes H358 EGFP-RhoA und H358 EGFP-RhoC-Zellen nachgewiesen werden.

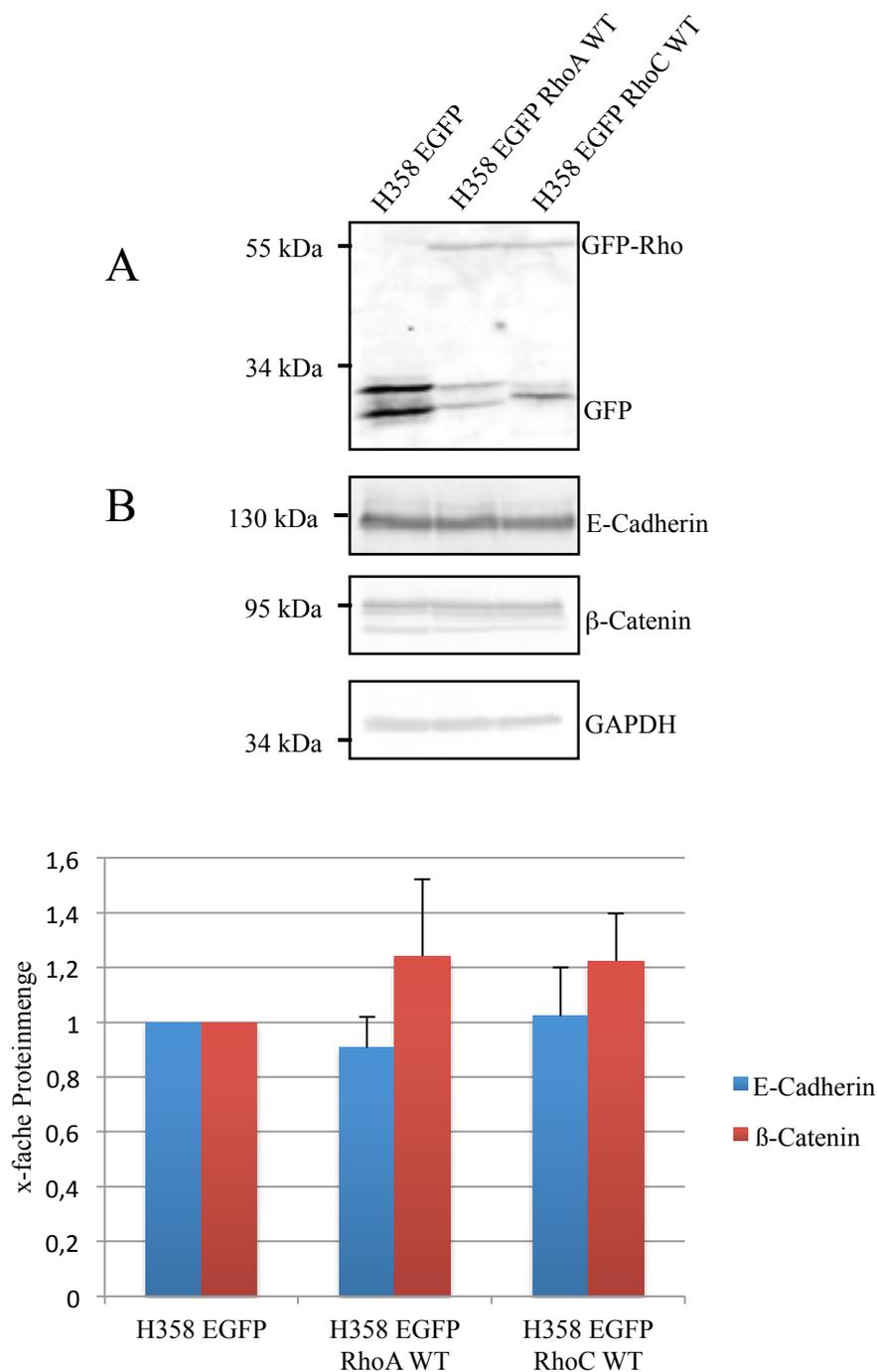


Abbildung 8: Gehalt von E-Cadherin und β-Catenin nach Überexpression von RhoA und RhoC in H358-Zellen. A) und B) H358-Zellen wurden im 6er Well mit den Plasmiden pEGFP, pEGFP/RhoA WT und pEGFP/RhoC WT transfiziert und für 24 h inkubiert. Es wurden 50 µg Protein im 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. EGFP, die EGFP-Fusionsproteine, E-Cadherin und β-Catenin wurden durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels Nah-Infrarot-Fluoreszenz. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=3). Die Grafik stellt die quantitative Auswertung mittels Densitometrie dar. Es wurden die Bandenintensitäten von E-Cadherin und β-Catenin in RhoA und RhoC transfizierten

H358-Zellen bestimmt, auf den Gehalt von GAPDH normalisiert und mit der Bandenintensität der EGFP-transfizierten Zellen (entspricht dem Wert 1) in Relation gesetzt (n=3). Y-Achse: x-facher Proteingehalt

3.4.3 Einfluss von RhoA und RhoC auf den Proteingehalt von E-Cadherin und β -Catenin in H23-Zellen

H23-Zellen wurden, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, mit den Plasmiden pEGFP, pEGFP/RhoA WT und pEGFP/RhoC WT transient transfiziert. Nach 48 h Inkubationszeit wurde die Transfektionseffizienz durch Auszählung der fluoreszierenden Zellen bestimmt. In allen drei durchgeführten Versuchen betrug die Transfektionsrate etwa 25 % für pEGFP transfizierte und circa 20 % für pEGFP/RhoA WT und circa 15% für pEGFP/RhoC WT transfizierte H23-Zellen. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Proteinmenge im Immunoblot bestimmt.

Im Immunoblot wurde zunächst die Expression der EGFP-RhoA- sowie der EGFP-RhoC-Fusionsproteine auf Proteinebene überprüft. Wie in Abbildung 9A zu sehen ist, werden die EGFP-Rho-Fusionsproteine mit einer Molekulargröße von 55 kDa in den H23-Zellen exprimiert. In den H23 EGFP-Zellen ist EGFP bei einer Molekulargröße von 21 kDa detektierbar.

Des Weiteren wurden die Proteine E-Cadherin und β -Catenin nachgewiesen (Abbildung 9B). Die höchste Konzentration von E-Cadherin ist hierbei in den RhoC transfizierten Zellen gefolgt von den RhoA transfizierten Zellen nachweisbar. Der Proteingehalt von β -Catenin verhält sich in ähnlicher Weise, wobei die größte Menge ebenfalls in H23 EGFP-RhoC Zellen nachgewiesen werden konnte. Die Grafik zeigt, dass E-Cadherin in EGFP-RhoA transfizierten H23-Zellen mit einer 1,27fachen ($\pm 0,26$ SD) Proteinmenge und in EGFP-RhoC transfizierten Zellen mit einer 1,53fachen ($\pm 0,29$ SD) Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle exprimiert wird. Für β -Catenin konnte in EGFP-RhoA Zellen die 1,78fache ($\pm 1,06$ SD) Proteinmenge und für EGFP-RhoC Zellen die 2,25fache ($\pm 0,7$ SD) Proteinmenge im Vergleich zur Referenzproteinmenge EGFP transfizierter Zellen detektiert werden. Hierbei zeigte sich in zwei von drei durchgeführten Versuchen mit RhoA und RhoC-transfizierten H23-Zellen eine Steigerung der Proteinmenge von E-Cadherin, in jeweils einem Versuch zeigte sich keine Veränderung der Proteinmenge. Die Detektion von β -Catenin in RhoA transfizierten Zellen ergab ebenfalls deutliche Unterschiede in den Bandensignalen, was die Stan-

dardabweichung dieser Versuchsreihe deutlich macht. Es wurde jedoch in jedem Versuch die gleiche Tendenz, eine Erhöhung der Proteinmenge in den transfizierten Zellen, nachgewiesen. Es ist jeweils der Immunoblot dargestellt, welcher den Mittelwert dreier Versuche repräsentativ darstellt.

Zusammenfassend ließ sich durch die Überexpression von RhoA in den H23-Zellen eine Steigerung der Proteinmenge von E-Cadherin und β -Catenin nachweisen, welche aufgrund der großen Streuung jedoch mit Einschränkung betrachtet werden muss. Durch die Überexpression von RhoC ließ sich ebenfalls eine Steigerung der Proteinmenge von E-Cadherin und β -Catenin nachweisen.

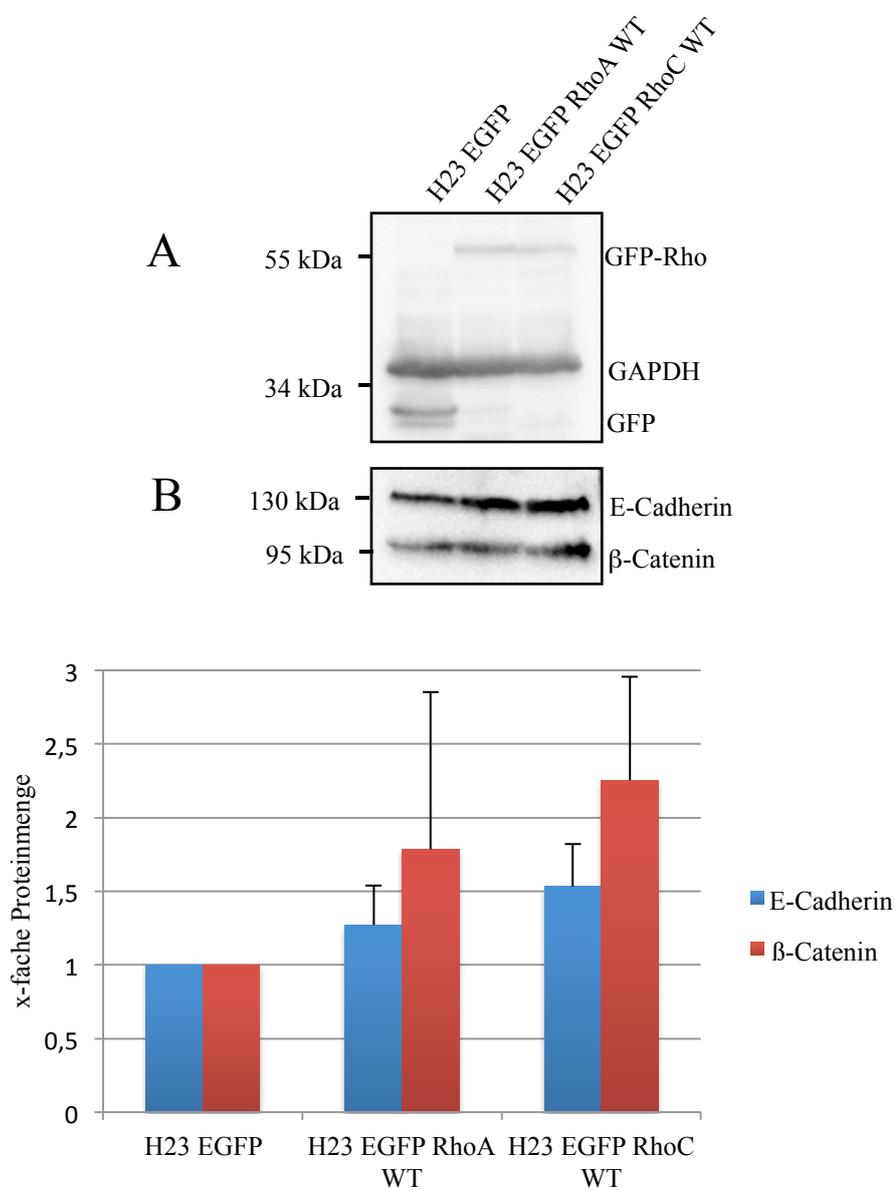


Abbildung 9: Gehalt von E-Cadherin und β -Catenin nach Überexpression von RhoA und RhoC in H23-Zellen. A) und B) H23-Zellen wurden transient mit pEGFP, pEGFP-RhoA WT und pEGFP-RhoC WT transfiziert. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und 50 μ g Protein im 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis von EGFP-Rho, EGFP, E-Cadherin und β -Catenin erfolgte mittels Immunoblot und spezifischen Antikörpern. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenzverfahren. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von GAPDH. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=3). Die Grafik stellt die quantitative Auswertung mittels Densitometrie dar. Es wurden die Bandenintensitäten von E-Cadherin und β -Catenin in RhoA und RhoC transfizierten H23-Zellen bestimmt, auf den Gehalt von GAPDH normalisiert und mit der Bandenintensität der EGFP-transfizierten Zellen (entspricht dem Wert 1) in Relation gesetzt (n=3). Y-Achse: x-facher Proteingehalt

3.4.4 Einfluss von RhoA und RhoC auf den Proteingehalt von E-Cadherin und β -Catenin in A549-Zellen

Zuletzt wurden in A549-Zellen die Proteine RhoA und RhoC überexprimiert und anschließend der Proteingehalt von E-Cadherin und β -Catenin in den Zellen bestimmt. Hierzu wurden ebenfalls die Plasmide pEGFP, pEGFP/RhoA WT und pEGFP/RhoC WT in A549-Zellen, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, transient transfiziert. Die Transfektionseffizienzen lagen in allen durchgeführten Versuchen nach Auszählung der fluoreszierenden Zellen im Mikroskop bei ca. 20 % für die Transfektion mit pEGFP Plasmid-DNA, bei ca. 30 % für die Transfektion von pEGFP/RhoA WT Plasmid-DNA und bei ca. 25 % für die Transfektion von A549 mit pEGFP/RhoC Plasmid-DNA. Die Abbildung 10A zeigt den Gehalt an GFP-Rho-Fusionsprotein und GFP in EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC exprimierenden Zellen. Es ist zu erkennen, dass die EGFP-RhoA sowie EGFP-RhoC exprimierenden A549-Zellen das GFP-Fusionsprotein mit einer Molekulargröße von 55 kDa exprimieren. In A549 EGFP-RhoA Zellen wurde zudem ein Bandensignal bei einer Molekulargröße von etwa 25 kDa erkannt, welches vermutlich ein Degradationsprodukt des GFP-Fusionsproteins darstellt.

In Abbildung 10B ist der Proteingehalt von E-Cadherin und β -Catenin in EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden A549-Zellen dargestellt. Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung des Immunoblots mittels Densitometrie. Hierbei wurden die Bandenintensitäten von E-Cadherin und β -Catenin der RhoA und RhoC transfizierten Zellen ermittelt und mit den Bandenintensitäten der EGFP transfizierten Zelllinie, welche als Kontrolle diente und gleich 1 gesetzt wurde, verglichen. Aus der Grafik ist zu entnehmen, dass in EGFP-RhoA transfizierten Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, E-Cadherin in einer 0,99fachen ($\pm 0,03$ SD) und β -Catenin in einer 1,08fachen ($\pm 0,29$ SD) Proteinmenge vorliegt. Durch die Überexpression von RhoA ließ sich somit in A549-Zellen keine Änderung der Proteinmenge von E-Cadherin und β -Catenin nachweisen. Für RhoC transfizierte Zellen ergab die densitometrische Auswertung im Mittelwert eine Erhöhung der E-Cadherinproteinmenge um den Faktor 1,18 ($\pm 0,24$ SD) und eine Erhöhung der β -Cateninproteinmenge um den Faktor 1,26 ($\pm 0,24$ SD). In den RhoC-transfizierten Zellen wurde in zwei von drei Versuchen eine minimale Steigerung der Proteinmenge gezeigt. In jeweils einem Versuch wurde eine nahezu identische

Menge für β -Catenin und E-Cadherin detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot der Mittelwerte dreier Versuche.

Zusammenfassend hat die Überexpression von RhoA keine Änderung auf die Proteinmenge von E-Cadherin oder β -Catenin zur Folge. In den RhoC überexprimierenden A549-Zellen ließ sich eine leicht erhöhte Menge E-Cadherin und β -Catenin nachweisen.

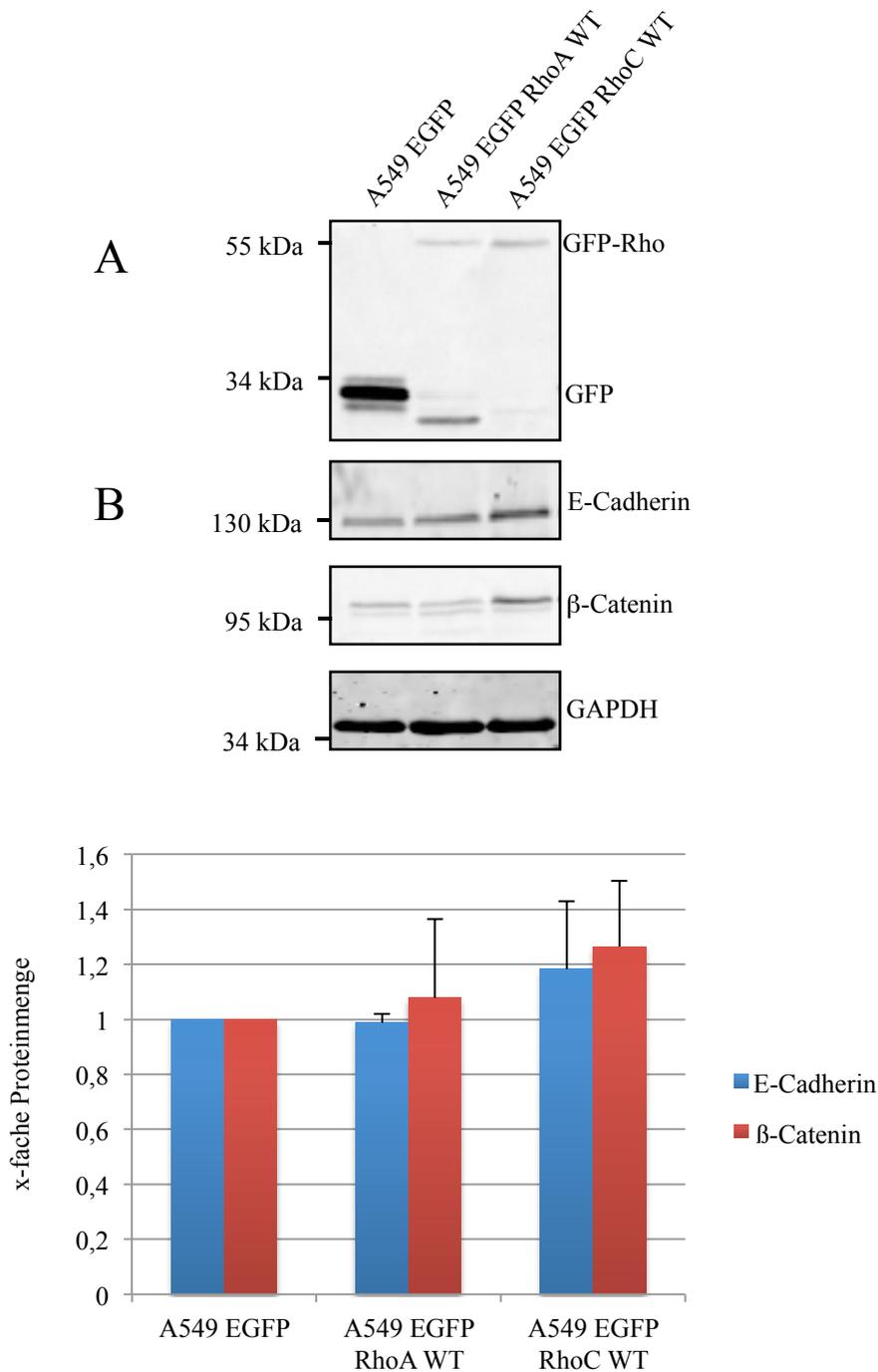


Abbildung 10: Einfluss von RhoC und RhoA auf den Gesamtproteingehalt von E-Cadherin und β -Catenin in A549-Zellen. A549-Zellen wurden transient mit pEGFP, pEGFP-RhoA WT und pEGFP-RhoC WT Plasmid-DNA transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die Transfektionseffizienz dokumentiert und die Zellen aufbereitet. 50 μ g Protein wurden im 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Immunoblot unter Einsatz spezifischer Antikörper und Nah-Infrarot-Lumineszenz. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. Die Grafik stellt die quantitative Auswertung mittels Densitometrie dar. Es wurden die Bandenintensitäten von E-Cadherin und β -Catenin in RhoA und RhoC transfizierten A549-Zellen bestimmt, auf den Gehalt von GAPDH normalisiert und mit der Bandenintensität der EGFP-transfizierten Zellen (entspricht dem Wert 1) in Relation gesetzt (n=3). Y-Achse: x-facher Proteinwert

3.4.5 Einfluss von RhoA und RhoC auf den E-Cadherin-Catenin-Komplex in A549-Zellen

Nachdem der Gesamtgehalt von E-Cadherin und β -Catenin nach Überexpression von RhoA und RhoC bestimmt wurde, sollte nun die Proteinzusammensetzung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes in transfizierten A549-Zellen überprüft werden. Um den Einfluss der kleinen Rho-GTPasen auf den Adhäsionskomplex zu untersuchen, wurden 500 μ g Lysat der EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC exprimierenden A549-Zellen eingesetzt und eine Immunpräzipitation durchgeführt. Mittels eines Anti-E-Cadherin-Antikörpers konnte E-Cadherin präzipitiert werden und assoziiertes β -Catenin im Immunoblot nachgewiesen werden (Abbildung 11). Um die Menge der präzipitierten Proteine mit der endogenen Proteinmenge der Zellen im Gesamtlisat vergleichen zu können, wurde 1/10 = 50 μ g Protein des Präzipitationsansatzes als Bindungskontrolle aufgetragen. Zunächst erfolgte die Detektion von E-Cadherin im Immunoblot um eine erfolgreiche Präzipitation nachweisen zu können und im nächsten Schritt der Nachweis des kopräzipitierten β -Catenin, was in Abbildung 11 dargestellt ist. Die Grafik zeigt die quantitative, densitometrische Auswertung aller Bandenintensitäten. Die detektierten Proteinmengen der mit einem Leervektor transfizierten Zellen wurde hierbei gleich 1 gesetzt. Mit pEGFP-RhoA transfizierte A549-Zellen wiesen eine 1,04fache (\pm 0,07 SD) erhöhte Proteinmenge E-Cadherin auf und eine 1,53fache (\pm 0,92 SD) Proteinmenge an kopräzipitiertem β -Catenin. In RhoC transfizierten A549-Zellen konnte für E-Cadherin die 1,61fache (\pm 0,54 SD) und für β -Catenin die 1,42fache (\pm 0,67 SD) Proteinmenge nachgewiesen werden. Insgesamt korreliert die kopräzipitierte Proteinmengenverteilung von β -Catenin mit der Proteinmengenverteilung im Gesamtlisat.

Die Überexpression von RhoA und RhoC scheint einen positiven Einfluss auf die Adhäsionskomplexbildung zu haben, wobei die RhoC transfizierten A549-Zellen die höchste Menge des E-Cadherin-Catenin-Komplexes aufweisen.

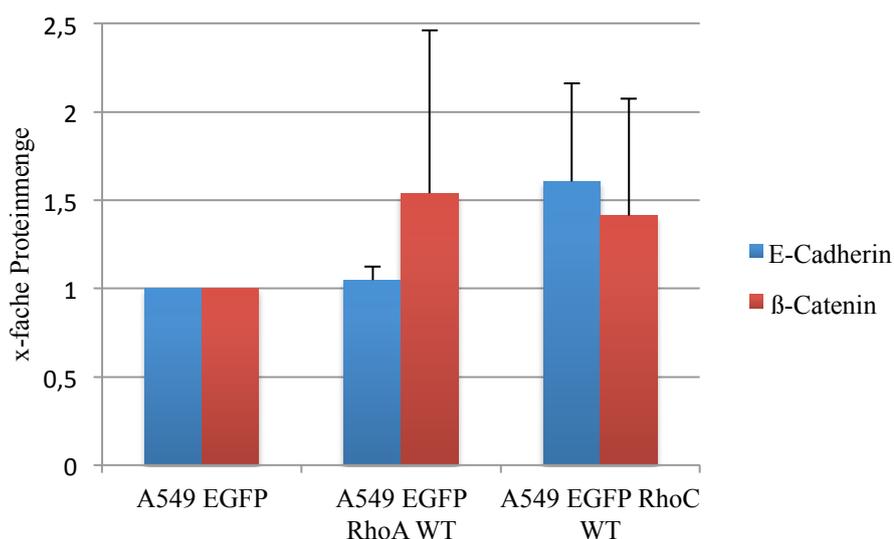
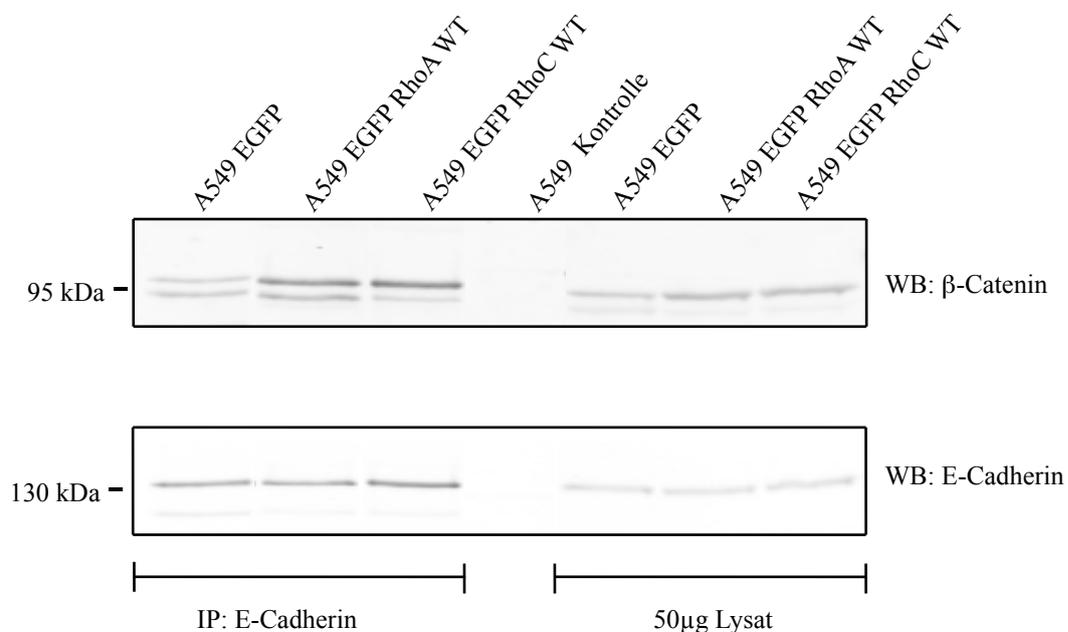


Abbildung 11: Proteingehalt von E-Cadherin und β -Catenin im Cadherin-Catenin-Komplex nach Überexpression von RhoA und RhoC. Es wurde 500 μ g Protein eingesetzt und mittels eines monoklonalen E-Cadherin-Antikörpers E-Cadherin präzipitiert. Als Kontrolle wurde 500 μ g Lysat ohne Antikör-

per präzipitiert um unspezifische Bindungen erkennen zu können. Das Präzipitat wurde eluiert und im 7,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Immunoblot wurde mit spezifischen Antikörpern behandelt, welche mittels der Nah-Infrarot-Luminiszenz detektiert wurden. Zur Kontrolle diente 500 µg A549 Protein. Zudem wurde zur Bindungskontrolle 1/10 = 50 µg Protein des Präzipitationsansatzes aufgetragen. In der Grafik sind die x-fachen Proteinmengen von E-Cadherin und β -Catenin in RhoA und RhoC transfizierten A549-Zellen in Relation zu rein EGFP-transfizierten Zellen dargestellt. Diese wurden mittels densitometrischer Auswertung mit der Software Image Studio Lite Version 5.0 ermittelt. Als Referenzwert dienten die mit dem Leervektor EGFP transfizierten Zellen, welche gleich 1 gesetzt wurden. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Werte der Bandenintensitäten des β -Catenin-Nachweises sowie die Werte des E-Cadherin Nachweises in A549 EGFP RhoC-Zellen zeigten hierbei eine große Streuung, weshalb die Ergebnisse mit Einschränkung zu betrachten sind.

4 Diskussion

Das Lungenkarzinom ist die am häufigsten zum Tode führende Tumorerkrankung in Deutschland (Robert Koch-Institut 2016). Die Therapie ist besonders im fortgeschrittenen Stadium limitiert und die Prognose ist bei erfolgter Fernmetastasierung mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur noch 4 % schlecht (Siegel et al. 2016).

Eine besonders wichtige Rolle spielt in der Pathogenese der Metastasierung eines malignen Tumors die zelluläre Adhäsion mit ihrer Hauptkomponente, dem transmembranen Glykoprotein E-Cadherin. Die Zelle durchläuft beim Prozess der Metastasierung den Vorgang der EMT, verliert also ihren epithelialen Phänotyp und nimmt mesenchymale Charakteristika an (Kalluri und Weinberg 2009). Ein wichtiger Schritt ist hierbei der Verlust des Adhäsionsproteins E-Cadherin, was zu einer Schwächung des Adhäsionskomplexes führt und letztendlich in der Ablösung der Zelle aus ihrem Gewebsverbund resultiert (Birchmeier und Behrens 1994; Kalluri und Weinberg 2009). Zudem erlangt die Zelle beim Prozess der Metastasierung eine migratorische Aktivität um sich fortbewegen zu können. Entscheidend für die Regulation der mesenchymalen Migration sind die kleinen Rho-GTPasen (Karlsson et al. 2010). RhoA, Rac1 und Cdc42 sind essentiell an der Umstrukturierung des Zytoskeletts beteiligt, welche sowohl bei der Migration einer Zelle als auch bei der Neuformation von Adhäsionskontakten eine wichtige Rolle spielen (Schaefer et al. 2014). RhoA kontrolliert durch die Strukturierung der Stressfasern, welche durch eine Bündelung von Aktin und Myosin-II entstehen, die dynamische Aktivität der Zelle sowie die Formation der Adhäsionskontakte (Yamada and Nelson 2007). RhoC wird eine stark metastasierungsfördernde Eigenschaft zugesprochen, wobei der genaue Pathomechanismus noch nicht bekannt ist (zusammengefasst in Ridely 2013). Bereits mehrere Studien konnten zeigen, dass eine Überexpression von RhoC in Karzinomzellen, wie auch in Tumorzellen des Lungenkarzinoms, zu einer erhöhten Invasivität führt (Shikada et al 2013). Durch welche genauen Mechanismen RhoC die Motilität und Invasivität der Lungenkarzinomzellen fördert ist bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, welche Auswirkungen die Rho-GTPasen RhoA und RhoC in Lungenkarzinomzellen auf den Adhäsionskomplex haben, insbesondere auf seine Hauptkomponente E-Cadherin und somit eventuell zur Förderung der Metastasierung einer Tumorzelle beitragen könnten.

4.1 Charakterisierung des E-Cadherin-Catenin-Adhäsionskomplexes

In dieser Arbeit wurde zunächst der Proteingehalt der Cadherine und Catenine in verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien untersucht. Hierbei wurden die epithelialen Cadherine E-Cadherin und P-Cadherin und die mesenchymalen Cadherine N-Cadherin und Cadherin-11, sowie die am Adhäsionskomplex assoziierten Catenine α -Catenin, β -Catenin, γ -Catenin und p120ctn mittels Immunoblotverfahren im RIPA-Lysat von neun Lungenkarzinomzelllinien nachgewiesen. Bei der Auswahl der Zellen aus unterschiedlichen Gewebearten wurde der Differenzierungsgrad berücksichtigt, sodass gut, mittelgradig und schlecht differenzierte Zelllinien analysiert wurden. Insgesamt stellen die einzelnen analysierten Zelllinien eine sehr heterogene Gruppe in Bezug auf die Cadherinexpression dar. Es fällt auf, dass sich in allen analysierten Zelllinien trotz ähnlicher Tumorentität unterschiedliche Proteinmengen an Cadherinen nachweisen ließen. Zu beachten ist jedoch, dass tumoröse Zellen je nach Entwicklungsstufe, Phänotyp und Migrationspotential unterschiedliche Cadherin-Expressionsmuster aufweisen können (Halbleib und Nelson 2006). Vier der neun analysierten Zelllinien des Lungenkarzinoms zeigten einen hohen Proteingehalt an E-Cadherin (Abbildung 1). Hierbei korreliert die Proteinmenge des E-Cadherins zum Teil mit dem Differenzierungsgrad der Zelllinie. Die gut differenzierte Zelllinie H358, welche dem bronchoalveolärem Karzinom zuzuordnen ist, und die epitheliale Zelllinie HTB-55 weisen einen besonders hohen Gehalt an E-Cadherin auf. Ähnliche Ergebnisse wurden zuvor von den Arbeitsgruppen Bremnes und Lim erzielt, welche bereits zeigten, dass die höchsten Level an E-Cadherin und dem Cadherin-Catenin-Komplex assoziierten Cateninen in gut differenzierten Lungenkarzinomen wie dem bronchoalveolären Karzinom exprimiert werden (Bremnes et al. 2002b; Lim et al. 2000). Die Zelllinien SCLC-21H, welche dem Gewebe des kleinzelligen Bronchialkarzinoms entspringt, sowie die Adenokarzinomzelllinie Colo 699 exprimieren hingegen kein epitheliales Cadherin, jedoch hohe Mengen an mesenchyalem N-Cadherin (Abbildung 1). Bereits bekannt ist, dass Zellen mit einem erhöhten Gehalt von N-Cadherin auch eine erhöhte Invasivität und ein erhöhtes Migrationspotential aufweisen (Islam et al. 1996). Eine erhöhte Expression von N-Cadherin mit einhergehendem Verlust der Expression von E-Cadherin wird zudem bei der Epithelial-mesenchymalen Transition beobachtet (Islam et al. 1996; Araki et al. 2011). Eine erhöhte Expression von N-Cadherin bei fehlender Expression von E-Cadherin wurde in

dieser Arbeit in den Zelllinien SCLC-21H und Colo 699 nachgewiesen, wobei die Zelllinie SCLC-21H dem Gewebe des kleinzelligen Lungenkarzinoms mit einem hohen Metastasierungspotential entspringt. In den Lungenkarzinomzelllinien H1688 und A549 ließ sich sowohl das mesenchymale N-Cadherin als auch das epitheliale E-Cadherin in hohem Maße nachweisen. Bereits bekannt ist, dass auch Tumorzellen, welche simultan E-Cadherin und N-Cadherin exprimieren, eine hohe Invasivität aufweisen (Nieman et al 1999). Eine erhöhte Invasivität einer Tumorzelle ist somit nicht zwangsläufig mit einem Verlust von E-Cadherin assoziiert, sodass allein aufgrund der Expression von E-Cadherin und/oder N-Cadherin keine eindeutige Aussage über die Invasivität einer Tumorzelle gemacht werden kann.

Das mesenchymale Cadherin-11 wurde während dieser Arbeit in den Zelllinien H23, A549, Colo 699 und in besonders hohem Maße in der gut differenzierten H358-Zelllinie nachgewiesen. Eine aktuelle Studie von Birtolo et al. beschreibt im Pankreaskarzinom die verstärkte Expression von Cadherin-11 als migrations- und invasionsfördernd (Birtolo et al. 2017). Entgegengesetzt steht eine Studie, welche die Expression von Cadherin-11 in Zellen des Ovarialkarzinoms und benignen Ovarialtumoren untersuchte und keinen Unterschied in der Prognose durch eine Überexpression von Cadherin-11 feststellen konnte (von Bülow et al. 2015). In Lungenkarzinomzellen wurde die Funktion und Eigenschaft von Cadherin-11 bisher nicht untersucht. Insgesamt scheint Cadherin-11 in Anbetracht der geringen Expression im Vergleich zu den anderen Cadherinen eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

P-Cadherin ließ sich in nur zwei der neun Lungenkarzinomzelllinien nachweisen. In der epithelialen Zelllinie H358 in hoher Menge und in der ebenfalls epithelialen Zelllinie HTB-55 in sehr geringer Menge. In Tumorzellen, wie auch dem Lungenkarzinom, korreliert die Überexpression von P-Cadherin häufig mit einer höheren Aggressivität des Tumors und somit einer schlechten Prognose (Imai et al. 2018; Viera und Paredes 2015). Die Expression von P-Cadherin in der Zelllinie H358, welche dem bronchoalveolärem Lungenkarzinom zuzuordnen ist und sehr selten metastasiert, deutet eher auf eine Funktion von P-Cadherin im klassischen adhäsiven Sinn als auf eine Funktion als Onkogen hin.

In weiteren Versuchen erfolgte die Untersuchung des Proteingehaltes von α -, β - und γ -Catenin sowie p120ctn in Lungenkarzinomzellen. Gebunden an Cadherine bilden sie

den Adhäsionskomplex und stellen die Verbindung zum Aktinzytoskelett dar. In den Zelllinien HTB-55, H1688, H358 und A549 ließen sich insgesamt die größten Mengen aller nachgewiesenen Catenine detektieren, welche ebenfalls hohe Menge an E-Cadherin aufwiesen. Somit besteht die Vermutung, dass diese Proteine in einem Komplex assoziiert sind. Die Zelllinien A427, Colo 699 und SCLC-21H hingegen exprimieren kein E-Cadherin, jedoch in geringeren Mengen α -, β - und γ -Catenin. Denkbar wäre, dass die nachgewiesenen Catenine mit einem in dieser Arbeit nicht analysierten Cadherin der Cadherinfamilie einen Komplex bilden. Wahrscheinlicher jedoch ist, dass die Catenine, insbesondere β -Catenin, in diesen Zelllinien keine adhäsive Funktion haben, sondern eher in Signalkaskaden im Zytosol Effekte ausüben. Bereits nachgewiesen ist, dass der Wnt-Signalweg in der Zelllinie A427, in welcher β -Catenin ein essentieller Bestandteil der Signalkaskade darstellt, konstitutiv aktiviert ist (Sunage et al. 2001).

β -Catenin konnte in allen Lungenkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Welche Funktionen β -Catenin ausübt, hängt von der Lokalisation in der Zelle ab. Gebunden an E-Cadherin kann β -Catenin eine adhäsive Funktion an der Membran ausüben und die Tumorzelle im Gewebsverbund stabilisieren. Ist β -Catenin im Nukleus lokalisiert, induziert es die Transkription von Genen, welche den Zellzyklus, die Zellproliferation und somit die Tumorgenese stimulieren (Nagar et al. 1996; Li et al. 2013; Jin et al. 2017). Der absolute Proteingehalt von β -Catenin im Western-Blot gibt somit keinen direkten Aufschluss über die Funktion von β -Catenin in den einzelnen Tumorzellen. Um die Lokalisation von β -Catenin zu untersuchen wurden in dieser Arbeit Immunfluoreszenzen durchgeführt. β -Catenin konnte vorwiegend an der Membran benachbarter Lungenkarzinomzellen und assoziiert an E-Cadherin nachgewiesen werden (Abbildungen 4-6). Die Arbeitsgruppe von Liu et al. hat aus entnommenem Lungenkarzinomgewebe (NSCLC) von Patienten die Lokalisation von β -Catenin immunhistochemisch untersucht und mit der 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten verglichen. Hierbei zeigte sich, dass eine nukleäre und eine zytoplasmatische Lokalisation von β -Catenin mit einer geringeren Überlebenszeit und eine membranständige Lokalisation mit einer etwas erhöhten 5-Jahres-Überlebenszeit korreliert (Li et al. 2013, zusammengefasst in Jin et al. 2017). Insgesamt bewirkt der vermehrte Einbau von β -Catenin in den E-Cadherin-Catenin-Komplex somit eine geringere Konzentration im Zytoplasma und wirkt sich

präventiv gegenüber einer vermehrten β -Catenin induzierten Zellproliferation und Invasivität aus.

P120ctn ist ebenfalls für die Bildung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes unverzichtbar. P120ctn kann in mehreren Isoformen vorliegen, welche durch die Verwendung unterschiedlicher Startkodons und durch alternatives Spleißen entstehen können (Keirseblick et al. 1998). Untersuchungen von Seidel et al. zeigten, dass in Pankreaskarzinomzellen vorwiegend die Isoform 3, welche einer Molekulargröße von 95 kDa entspricht, an E-Cadherin bindet und dies in einer starken Zell-Zell-Adhäsion resultiert (Seidel et al. 2004). Liu et al. beschrieben in Lungenkarzinomzellen, dass verschiedene Isoformen des p120ctn den Proteingehalt von E-Cadherin unterschiedlich beeinflussen können und dies auch von der Lokalisation des p120ctn in der Zelle abhängt. Eine Überexpression der Isoform 3A, sowohl membranständig als auch zytosolisch lokalisiertes p120ctn, resultiert hierbei in einer erhöhten Proteinmenge von E-Cadherin und einer geringeren Invasivität der Tumorzellen (Zhang et al. 2014). In dieser Arbeit konnten in allen neun Lungenkarzinomzellen Banden in Höhe von 95 kDa detektiert werden, was der Isoform 3 entsprechen könnte. In den durchgeführten Immunpräzipitationen der Zelllinien A549, H358 und HTB-55 ließ sich eine bevorzugte Bindung der Isoform 3 mit einem Molekulargewicht von ca. 95 kDa an E-Cadherin nachweisen. In H23-Zellen zeigte sich eine Bindung einer Isoform höheren Molekulargewichtes, sodass anzunehmen ist, dass auch andere Isoformen mit E-Cadherin im Komplex vorliegen können. Die durchgeführten Immunfluoreszenzen der Lungenkarzinomzelllinien A549, H358 und H23 bestätigten eine vorwiegend membranständige Lokalisation des p120ctn im Bereich der Zell-Zell-Kontakte (Abbildung 4-6).

Eine direkte bzw. indirekte Bindung von E-Cadherin mit β -Catenin, α -Catenin und p120ctn konnte in den ausgewählten Zelllinien A549, H358, HTB-55 und H23 mittels Co-Immunopräzipitation nachgewiesen werden (Abbildung 3) und so das Vorliegen des E-Cadherin-Catenin-Komplex gezeigt werden. In den durchgeführten Immunfluoreszenzen mit A549, H358 und H23-Zellen zeigte sich zudem, dass E-Cadherin, α -, β -Catenin und p120ctn vorwiegend an der Membran im Bereich der Zell-Zell-Kontakte lokalisiert sind (Abbildung 4-6). In H23-Zellen konnte in vereinzelt Zellen ohne Kontakt zu Nachbarzellen E-Cadherin und p120ctn vermehrt perinukleär nachgewiesen werden (Abbildung 5). Das Vorliegen der Adhäsionskomplexe deutet in den analysier-

ten Zelllinien auf einen starken mechanischen Halt innerhalb ihres Gewebsverbundes hin, trotz ihres karzinomatösen Ursprunges. Um sich aus dem Zellverband lösen zu können, müssten weitere molekulare Mechanismen in den Lungenkarzinomzelllinien aktiviert werden. Auslösende Signale für eine EMT kommen in der Regel aus dem umliegenden Stroma der Karzinomzelle wie beispielsweise TGF- β und induzieren eine intrazelluläre Signalkaskade und Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Snail (Kokudo et al. 2008). Letzendlich bewirkt dieser Prozess ein Verlust von E-Cadherin und eine Schwächung der Adhäsionskomplexe (Birchmeier und Behrens 1994; zusammengefasst in Kalluri und Weinberg 2009). In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die intrazellulären GTPasen RhoA und RhoC gesetzt und deren Einfluss auf E-Cadherin, β -Catenin und den Adhäsionskomplex untersucht.

4.2 Expression der Rho-GTPasen RhoA und RhoC in Lungenkarzinomzellen

Bereits bekannt ist, dass Rho-GTPasen in vielen Karzinomzellen unterschiedlicher Tumorentitäten überexprimiert sind und eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung spielen (Karlsson et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte in allen analysierten Lungenkarzinomzellen RhoA und RhoC in unterschiedlicher Menge nachgewiesen werden (Abbildung 7). Die höchsten Proteinnengen von RhoC ließen sich in den Zelllinien H358 und H1688 nachweisen, gefolgt von den Zelllinien A427, A549, H23 und HCC44. Die Zelllinien HTB-55, Colo 699 und SCLC-21H wiesen die geringsten Proteinkonzentrationen auf. Die höchsten Proteinnengen von RhoA ließen sich in den Zelllinien H1688, Colo 699 und H358 nachweisen. Auch die Zelllinien A549, A427, HCC-44 und HTB-55 wiesen hohe Mengen an RhoA auf. In den Zelllinien H23 und SCLC-21H wurden die geringsten Proteinnengen an RhoA nachgewiesen.

Mutationen der kodierenden Gene RhoA und RhoC wurden bisher nicht in Tumorzellen beschrieben, sodass angenommen wird, dass eine Überexpression von den kleinen Rho-GTPasen auf Transkriptions- oder Translationsebene entsteht (Karlsson et al 2009). Um in dieser Arbeit eine Überexpression der Rho-GTPasen RhoA und RhoC zu erzielen, wurden die Zelllinien A549, H358 und H23 transient mit den Plasmiden pEGFP, pEGFP/RhoA WT und pEGFP/RhoC WT transfiziert. Die durchschnittliche Transfektionseffizienz war in allen Zelllinien in etwa vergleichbar und betrug im

Durchschnitt jeweils ca. 20%. Die erfolgreiche Transfektion wurde im Anschluss im Immunoblot überprüft und in den Lungenkarzinomzelllinien H358, H23 und A549 nachgewiesen.

Rho-GTPasen können in einer aktivierten GTP-gebundenen Form, sowie einer inaktivierten GDP-gebundenen Form vorliegen, wobei nur das aktivierte RhoA bzw. RhoC mit nachgeschalteten Signalmolekülen reagiert (Wheeler und Ridley 2004; Parri und Chiarugi 2010; Ridley 2013). In dieser Arbeit wurde der absolute Proteingehalt von RhoA und RhoC betrachtet und keine Unterscheidung der unterschiedlich aktiven Formen vorgenommen. Somit kann ein Großteil der nachgewiesenen Rho-GTPasen in der inaktiven Form vorgelegen haben und der nachgewiesene Effekt auf die untersuchten Proteine E-Cadherin und β -Catenin abgeschwächt gewesen sein. Eine Differenzierung von Rho-GTP und Rho-GDP könnte in weiterführenden Versuchen erfolgen.

4.3 Einfluss der kleinen Rho-GTPasen auf den E-Cadherin-Catenin-Komplex

Hauptziel dieser Arbeit war, den Einfluss von RhoA und RhoC auf den E-Cadherin-Catenin-Komplex in Lungenkarzinomzellen zu untersuchen. Zudem war auch von Interesse, ob sich die beiden Rho-GTPasen in ihrer Funktion unterscheiden. Hierzu wurde durch transiente Transfektion eine Überexpression von RhoA und RhoC in Lungenkarzinomzelllinien erzielt und anschließend der Proteingehalt von E-Cadherin und β -Catenin in den pEGFP-RhoA und pEGFP-RhoC transfizierten Zelllinien untersucht. In der Zelllinie A549 wurde zudem der Einfluss auf den Proteingehalt des E-Cadherin-Catenin-Komplexes untersucht. Als Vergleich dienten Zellen, welche mit dem Leervektor pEGFP transfiziert wurden.

4.3.1 Einfluss von RhoA

RhoA bewirkt über die Regulation der kontraktilen Stressfasern die Ausbildung und Umstrukturierung der Adhäsionskontakte (Yamada and Nelson 2007; Ridley et al. 2013; Menke und Giehl 2012; Wheeler und Ridley 2004; Noren et al. 2007). RhoA kann dabei die Invasion und Migration der Tumorzelle entweder fördern oder inhibieren. In Pankreaskarzinomzellen sowie Brustkarzinomzellen scheint RhoA die Zellinva-

sion und Migration zu hemmen, in Zellen des Lungenkarzinoms zu fördern (Simpson et al. 2004, Dietrich et al. 2009, Asnaghi et al. 2010). Welchen Einfluss RhoA nimmt, scheint folglich mit der Tumorentität und dem zu analysierenden Kontext zusammenzuhängen. In der vorliegenden Arbeit ließ sich durch die Überexpression von RhoA eine minimale Steigerung der Proteinmenge von β -Catenin in H358-Zellen (Abbildung 8), eine Steigerung der Proteinmenge von E-Cadherin und β -Catenin in H23-Zellen (Abbildung 9) sowie eine leicht vermehrte Komplexbildung von E-Cadherin und β -Catenin in A549-Zellen nachweisen (Abbildung 11). Die Proteinmenge von E-Cadherin in H23-Zellen und die Gesamtproteinmenge von E-Cadherin und β -Catenin in A549-Zellen blieben in A549 EGFP-RhoA Zellen unverändert. RhoA scheint somit in den analysierten Lungenkarzinomzellen einen fördernden Effekt auf die Stabilität und Lebensdauer von E-Cadherin, β -Catenin und den E-Cadherin-Catenin-Komplex auszuüben. Inwieweit dies die Migration der Tumorzellen beeinflusst, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Aufgrund der invasionshemmenden Eigenschaft von E-Cadherin und dem E-Cadherin-Catenin-Komplex, ist jedoch davon auszugehen, dass die Tumorzellen durch die erhöhte Proteinexpression im Gewebsverbund stabilisiert werden und dies einen invasions- und migrationshemmenden Effekt in den analysierten Lungenkarzinomzellen ausübt (Birchmeier 1994; van Roy und Berx 2008). Ähnliche Untersuchungen führte in der Vergangenheit bereits die Arbeitsgruppe Asnaghi et al. durch. Sie untersuchten den Effekt der Überexpression von E-Cadherin auf RhoA in Lungenkarzinomzellen. Ihre Studie ergab, dass E-Cadherin den Proteingehalt von RhoA verringert und dies durch p190RhoGAP reguliert wird. Insgesamt führt dieser Effekt zu einer Hemmung der Zellmigration und Invasion (Asnaghi et al. 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Studie von Asnaghi et al. zusammenfassend, kann die Überexpression von RhoA den Proteingehalt von E-Cadherin fördern und die Überexpression von E-Cadherin den Proteingehalt von RhoA hemmen. Vermutlich wird diese konträre gegenseitige Regulation von RhoA und E-Cadherin durch unterschiedliche Effektorproteine vermittelt. Asnaghi et al. identifizierten als Effektor p190RhoGAP. Denkbar wären aber auch Rho-Interaktionspartner wie ROCK, p120ctn oder spezielle GEFs, welche Einfluss auf E-Cadherin und β -Catenin ausüben könnten (Menke und Giehl 2012). Die Arbeitsgruppe von Ratheesh identifizierte Centralspindlin als wichtigen Regulator zwischen RhoA und den Adhäsionskomplexen während der Interphase. Centralspindlin ist ein Proteinkomplex, welcher eine wichtige Rolle während der Zellteilung spielt und über

die Aktivierung von RhoA die Adhäsionskontakte regulieren kann. Als Interaktionspartner von Centralspindlin wurden RhoGEF ECT2 und α -Catenin identifiziert (Ratheesh et al. 2012).

Interessant ist, dass in A549 EGFP-RhoA Zellen eine leicht vermehrte Komplexbildung von E-Cadherin und β -Catenin nachgewiesen werden konnte (Abbildung 11), die endogene Proteinmenge von E-Cadherin und β -Catenin in A549 EGFP-RhoA Zellen gegenüber A549 EGFP-Zellen jedoch unverändert blieb (Abbildung 10). RhoA scheint somit in A549-Zellen auf den Gesamtgehalt von E-Cadherin und β -Catenin keinen Effekt zu haben, kann jedoch bewirken, dass E-Cadherin und β -Catenin leicht vermehrt im Komplex eingebaut werden. Es könnte sein, dass RhoA, wie bereits vielfach in der Literatur beschrieben, nicht nur die Bündelung und Neuformation der Adhäsionskontakte induzieren kann (Noren et al.; 2003, Noren et al. 2007; Yamada und Nelson 2007), sondern in A549-Zellen zudem die Komplexbildung fördert.

4.3.2 Einfluss von RhoC

RhoC ist bekannt als kleine Rho-GTPase mit metastasierungsfördernden Eigenschaften (Clark et al. 2000; Hakem et al. 2005; Dietrich et al. 2009). Vorhergehende Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten für Zellen des Pankreaskarzinoms, dass eine Überexpression von RhoC zu einer erhöhten Invasion und Migration der Tumorzellen führt (Dietrich et al. 2009). Auch in Zellen des Lungenkarzinoms ist beschrieben, dass eine erhöhte Invasivität mit einer erhöhten Expression von RhoC korreliert (Shikada et al. 2003; Lu et al. 2016). Die Arbeitsgruppe von Lu et al. untersuchte die Lungenkarzinomzelllinie A549 und den Einfluss von RhoC während der EMT. Nach der Stimulation mit TGF β wiesen die A549-Zellen eine erhöhte Aktivität von RhoC sowie eine höhere Invasivität auf (Lu et al. 2016). Ähnliche Ergebnisse erzielte Bellovin et al. in Zellen des Kolonkarzinoms. In dieser Studie wurde die Zellen mit TGF β und TNF α stimuliert um eine EMT auszulösen und anschließend stieg der Proteingehalt von RhoC an. Die Überexpression von RhoC bewirkte schließlich eine verstärkte Migration der Tumorzellen (Bellovin et al. 2006). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass eine erhöhte Expression von RhoC mit einer erhöhten Invasivität und verstärkten Migration korrelieren. Dies lässt vermuten, dass eine erhöhte Expression von RhoC eventuell auch zu einer Schwächung der Adhäsionskomplexe beiträgt. In der vorliegenden Arbeit ließ sich je-

doch in den mit pEGFP/RhoC-transfizierten Lungenkarzinomzelllinien H23 und A549 eine erhöhte Proteinmenge von E-Cadherin und β -Catenin nachweisen (Abbildungen 9 und 10) sowie eine leicht vermehrte Komplexbildung von E-Cadherin und β -Catenin in EGFP-RhoC A549-Zellen (Abbildung 11), was auf eine Stabilisierung der Adhäsion schließen lässt. In der vorliegenden Arbeit wurde im Gegensatz zu den beschriebenen vorhergehenden Studien von Bellovin et al. und Lu et al. ein höherer Proteingehalt von RhoC nicht durch TGF β oder TNF α induziert, sondern durch Transfektion erzielt. Zudem wurde nicht der direkte Effekt auf die Migration, sondern der Effekt auf E-Cadherin, β -Catenin und den Adhäsionskomplex untersucht. RhoC scheint jedoch in der vorliegenden Arbeit die Lebensdauer von E-Cadherin und β -Catenin und die Aufrechterhaltung des E-Cadherin vermittelten Adhäsionskomplexes eher zu fördern und somit einer Invasion der Zelle und anschließenden Migration entgegenzuwirken. In Anbetracht der metastasierungsfördernden Eigenschaft von RhoC erscheint dieser Effekt überraschend. Eine negative Regulation der E-Cadherin- und β -Cateninproteinmenge könnte durch andere Regulationsmechanismen als RhoA und RhoC in den untersuchten Lungenkarzinomzelllinien H23, H358 und A549 vermittelt werden. Für die Lungenkarzinomzelllinie A549 wurden beispielsweise bereits das *metastasis associated protein 2* (MTA2) sowie der Transkriptionsfaktor TLE1 beschrieben, welche eine verminderte E-Cadherin Expression in dieser Zelllinie bewirken können (Zhang et al. 2015, Yao et al. 2014).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein ähnlicher Effekt von RhoA und RhoC auf E-Cadherin und β -Catenin sowie den Adhäsionskomplex gezeigt werden, welcher vor allem in einer Erhöhung oder gleichbleibenden Proteinmenge von E-Cadherin und β -Catenin und einer Stabilisierung des E-Cadherin vermittelten Adhäsionskomplexes in den analysierten Lungenkarzinomzellen resultierte.

5 Zusammenfassung

Durch die Ausbildung von Adhäsionskontakten werden Zellen dazu befähigt sich aneinanderzulagern. Eine Funktionseinheit der Adhäsionskontakte ist der E-Cadherin-Catenin-Komplex. In Tumorzellen liegen die Adhäsionskontakte häufig in veränderter Ausprägung vor, was den Tumorzellen ermöglicht sich aus dem Gewebsverbund zu lösen und zu migrieren. In der vorliegenden Arbeit wurde der E-Cadherin-Adhäsionskomplex in verschiedenen Lungenkarzinomzellen analysiert und der Einfluss der kleinen Rho-GTPasen RhoA und RhoC auf den E-Cadherin-Adhäsionskomplex untersucht. Die neun verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien HTB-55, H2122, H23, A427, A549, Colo 699, H358, SCLC-21H und H1688 zeigten unterschiedliche Cadherinexpressionsmuster. Hierbei korreliert die E-Cadherinproteinmenge zum Teil mit den Differenzierungsgraden der Lungentumorzellen. Cadherin-11 und P-Cadherin scheinen aufgrund ihrer geringeren Expression in den Lungenkarzinomzellen eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die analysierten Catenine α -, β -, γ und p120ctn ließen sich in allen Lungenkarzinomzellen in unterschiedlichen Mengen nachweisen. Die höchsten Proteinmengen wurden in den Zelllinien A549, H358 und HTB-55 detektiert, welche ebenfalls die höchsten Proteinmengen an E-Cadherin aufwiesen. Durchgeführte Immunpräzipitationen konnten die direkte bzw. indirekte Bindung zwischen E-Cadherin, β -, α - und p120ctn nachweisen und somit das Vorliegen des E-Cadherin-Adhäsionskomplexes in den Zelllinien A549, H358 und H23 bestätigen. Per Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass der E-Cadherin-Adhäsionskomplex vorwiegend an der Membran benachbarter Zellen vorkommt. In der Zelllinie H23 scheint die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion aufgrund der geringen Konzentration des präzipitierten E-Cadherin-Catenin-Komplexes eher gering ausgeprägt.

Um den Einfluss der kleinen Rho-GTPasen auf den E-Cadherin-Adhäsionskomplex zu untersuchen, wurden die Zelllinien H358, H23 und A549 transient mit pEGFP Plasmid-DNA transfiziert um eine Überexpression von RhoA und RhoC zu erzielen. Durchgeführte Proteinanalysen zeigten in den Zelllinien H23 und A549 eine Erhöhung der Proteinmengen von E-Cadherin und β -Catenin sowie eine vermehrte Bildung des E-Cadherin-Adhäsionskomplexes in A549-Zellen. Insgesamt konnte in dieser Arbeit ein ähnlicher Effekt von RhoA und RhoC auf E-Cadherin und β -Catenin sowie den Adhäsions-

sionskomplex in den analysierten Lungenkarzinomzellen nachgewiesen werden, welcher in einer Erhöhung oder gleichbleibenden Proteinmenge von E-Cadherin und β -Catenin und einer Stabilisierung des E-Cadherin vermittelten Adhäsionskomplexes resultierte.

6 Summary

The formation of adhesion junctions enables cells to be attached to each other. One functional unit of the adhesion junctions is the E-cadherin-catenin complex. In tumor cells there is often an altered or reduced amount of adhesion junctions, which allows cells to detach from the tissue and migrate. In the present study the E-cadherin adhesion complex was examined in different lung carcinoma cells and the influence of the small Rho GTPases RhoA and RhoC on the E-cadherin adhesion complex was analyzed. The nine different lung carcinoma cell lines HTB-55, H2122, H23, A427, A549, Colo699, H358, SCLC-21H and H1688 showed different expression patterns of cadherins. The amount of E-cadherin correlates in part with the degrees of differentiation of the lung tumor cells. Cadherin-11 and P-cadherin showed a low expression in lung carcinoma cells and seemed to play a minor role in the cells. The analyzed catenins α -, β -, γ - and p120ctn were detected with different amounts in all lung carcinoma cells, whereby the largest amounts of protein were detected in the cell lines A549, H358 and HTB-55, which also had the largest amounts of E-cadherin. Immunoprecipitations were performed to detect the direct or indirect binding between E-cadherin, β -, α - and p120ctn and showed the presence of the E-cadherin adhesion complex in the cell lines A549, H358 and H23. Immunofluorescences studies revealed a membrane localisation of the E-cadherin-mediated adhesion complex especially in areas of cell-cell contacts.

To analyze the influence of the small Rho GTPases on the E-cadherin adhesion complex, the cell lines H358, H23 and A549 were transiently transfected to achieve overexpression of RhoA and RhoC. Protein analyzes showed in the transfected cell lines H23 and A549 an increase in the protein levels of E-cadherin and β -catenin as well as an increase in the E-cadherin adhesion complexes in A549 cells. Taken together a similar effect of RhoA and RhoC on E-cadherin and β -catenin as well as the adhesion complex was established in the analyzed lung carcinoma cells. The overexpression of Rho GTPases resulted in an increase or equal level of E-cadherin and β -catenin and the stabilization of the E-cadherin-mediated adhesion complex.

7 Literaturverzeichnis

- Araki, K.; Shimura, T.; Suzuki, H.; Tsutsumi, S.; Wada, W.; Yajima, T.; Kobayahi, T.; Kubo, N.; Kuwano, H. (2001): E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. In: *Br J Cancer* 105 (12), S. 1885-1893.
- Asnaghi, L.; Vass, W. C.; Quadri, R.; Day, P. M.; Qian, X.; Braverman, R. et al. (2010): E-cadherin negatively regulates neoplastic growth in non-small cell lung cancer: role of Rho GTPases. In: *Oncogene* 29 (19), S. 2760-2771.
- Auersperg, N.; Pan, J.; Grove, B. D.; Peterson, T.; Fisher, J.; Maines-Bandiera, S. et al. (1999): E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (11), S. 6249-6254.
- Bellovin, D. I.; Simpson, K. J.; Danilov, T.; Maynard, E.; Rimm, D. L.; Oettgen, P.; Mercurio, A. M. (2006): Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. In: *Oncogene* 25 (52), S. 6959-6967.
- Birchmeier, W.; Behrens, J. (1994): Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. In: *Biochim Biophys Acta* 1198 (1), S. 11-26.
- Birtolo, C.; Pham, H.; Morvaridi, S.; Chheda, C.; Go, V. L.; Ptasznik, A.; Edderkaoui, M.; Weisman, M. H.; Noss, E.; Brenner, M. B.; Larson, B.; Guindi, M.; Wang, Q.; Pandol, S.J. (2017): Cadherin-11 is a cell surface marker up-regulated in activated pancreatic stellate cells and is involved in pancreatic cancer cell migration. In: *Am J Pathol* 187 (1), S. 146-155.
- Blaschuk, O. W.; Sullivan, R.; David, S.; Pouliot, Y. (1990): Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. In: *Dev Biol* 139 (1), S. 227-229.
- Bohm, M.; Totzeck, B.; Birchmeier, W.; Wieland, I. (1994): Differences of E-cadherin expression levels and patterns in primary and metastatic human lung cancer. In: *Clin Exp Metastasis* 12 (1), S. 55-62.
- Braga, V. M.; Machesky, L. M.; Hall, A.; Hotchin, N. A. (1997): The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. In: *J Cell Biol* 137 (6), S. 1421-1431.
- Brasch, J.; Harrison, O. J.; Honig, B.; Shapiro, L. (2012): Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. In: *Trends Cell Biol* 22 (6), S. 299-310.

- Bremnes, R. M.; Veve, R.; Gabrielson, E.; Hirsch, F. R.; Baron, A.; Bemis, L. et al. (2002a): High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer. In: *J Clin Oncol* 20 (10), S. 2417–2428.
- Bremnes, Roy M.; Veve, R.; Hirsch, F. R.; Franklin, W. A. (2002b): The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. In: *Lung Cancer* 36 (2), S. 115–124.
- Cadranel, J.; Ruppert, A.; Beau-Faller, M.; Wislez, M. (2013): Therapeutic strategy for advanced EGFR mutant non-small-cell lung carcinoma. In: *Crit Rev Oncol Hematol* 88 (3), S. 477–493.
- Canel, M.; Serrels, A.; Frame, M. C.; Brunton, V. G. (2013): E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. In: *J Cell Sci* 126 (Pt 2), S. 393–401.
- Cano, A.; Perez-Moreno, M. A.; Rodrigo, I.; Locascio, A.; Blanco, M. J.; del Barrio, M G et al. (2000): The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. In: *Nat Cell Biol* 2 (2), S. 76–83.
- Chao, Y. L.; Shepard, C. R.; Wells, A. (2010): Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. In: *Mol Cancer* 9, S. 179.
- Chen, Y. T.; Stewart, D. B.; Nelson, W. J. (1999): Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. In: *J Cell Biol* 144 (4), S. 687–699.
- Chervin-Pétinot, Adeline; Courçon, Marie; Almagro, Sébastien; Nicolas, Alice; Grichine, Alexei; Grunwald, Didier et al. (2012): Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) interacts with α -catenin and actin filaments in endothelial cells and stabilizes vascular capillary network in vitro. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (10), S. 7556–7572.
- Clark, E. A.; Golub, T. R.; Lander, E. S.; Hynes, R. O. (2000): Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. In: *Nature* 406 (6795), S. 532–535.
- Deeb, G.; Wang, J.; Ramnath, N.; Slocum, Harry K.; Wiseman, S.; Beck, A.; Tan, D. (2004): Altered E-cadherin and epidermal growth factor receptor expressions are associated with patient survival in lung cancer: a study utilizing high-density tissue microarray and immunohistochemistry. In: *Mod Pathol* 17 (4), S. 430–439.

- Dietrich K. A.; Schwarz R.; Liska M.; Grass S.; Menke A.; Meiter M.; Kierschke G.; Längle C.; Genze F.; Giehl K. (2009): Specific induction and invasion of pancreatic carcinoma cells by RhoC, which differs from RhoA in its localisation and activity. In: *Biological Chemistry* 390 (10), S. 1063-1077.
- Ferketich, A. K.; Niland, J. C.; Mamet, Rizvan; Z., Carrie; D., Thomas A.; Ettinger, D. S. et al. (2013): Smoking status and survival in the national comprehensive cancer network non-small cell lung cancer cohort. In: *Cancer* 119 (4), S. 847–853.
- Frixen, U. H.; Behrens, J.; Sachs, M.; Eberle, G.; Voss, B.; Warda, A. et al. (1991): E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. In: *The Journal of cell biology* 113 (1), S. 173–185.
- Fukuoka, M.; Yano, S.; Giaccone, G.; Tamura, T.; Nakagawa, K.; Douillard, Jean-Yves et al. (2003): Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) corrected. In: *J Clin Oncol* 21 (12), S. 2237–2246.
- Gates, J.; Peifer, M. (2005): Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. In: *Cell* 123 (5), S. 769–772.
- Hakem, A.; Sanchez-Sweetman, O.; You-Ten, A.; Duncan, G.; Wakeham, A.; Khokha, R.; Mak, Tak W. (2005): RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. In: *Genes Dev* 19 (17), S. 1974–1979.
- Halbleib, J. M.; Nelson, W. J. (2006): Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. In: *Genes Dev* 20 (23), S. 3199–3214.
- Harris, Tony J. C.; Tepass, U. (2010): Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (7), S. 502–514.
- IARC (2003): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenesis risks to Humans. Volume 83. Tobacco smoke and involuntary smoking.
- Imai S.; Kobayashi M.; Takasaki C.; Ishibashi H.; Okubo K.; (2018): High expression of P-cadherin is significantly associated with poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. In: *Lung Cancer* 118 S. 13-19
- Islam, S.; Carey, T. E.; Wolf, G. T.; Wheelock, M. J.; Johnson, K. R. (1996): Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. In: *The Journal of cell biology* 135 (6 Pt 1), S. 1643–1654.

- Jin J.; Zhan P.; Katoh M.; Kobayashi S.; Phan K.; Qian H.; Li H.; Wang X.; Song Y. (2017): Prognostic significance of β -catenin expression in patients with non small cell lung cancer: a meta analysis. In: *Translational Lung Cancer Research* 6 (1), S. 97-108.
- Kalluri, R.; Weinberg, R. A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. In: *J Clin Invest* 119 (6), S. 1420–1428.
- Karlsson, R.; Pedersen, E. D.; Wang, Z.; Brakebusch, C. (2009): Rho GTPase function in tumorigenesis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1796 (2), S. 91–98.
- Keirseblick A.; Staes K.; van Hengel J.; Nollet F.; Reynolds A.; van Roy F. (1998): Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. In: *Genomics* 50 (2) S. 129-146
- Kris, M. G.; Natale, R. B.; Herbst, R. S.; Lynch, T. J. Jr; Prager, D.; Belani, C. P. et al. (2003): Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. In: *JAMA* 290 (16), S. 2149–2158.
- Kokudo, T.; Suzuki, Y.; Yoshimatsu, Y.; Yamazaki, T.; Watabe, T.; Miyazone K. (2008): Snail is required for TGF β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. In: *J Cell Sci* 121(Pt 20), S. 3317-24.
- Li L.F.; Wei Z.J.; Sun H.; Jiang B. (2014): Abnormal beta-catenin immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer: a meta-analysis. In: *World J Gastroenterol* 20:12313-21.
- Li X. Q.; Yang X. L.; Zhang G.; Wu S. P.; Deng X. B.; Xiao S. J.; Liu Q. Z.; Yao K. T.; Xiao G. H. (2013): Nuclear β -catenin accumulation is associated with increased expression of Nanog protein and predicts poor prognosis of non-small cell lung cancer. In: *Journal of Translational Medicine* (11), S. 114.
- Lim, S. C.; Jang, I. G.; Kim, Y. C.; Park, K. O. (2000): The role of E-cadherin expression in non-small cell lung cancer. In: *J Korean Med Sci* 15 (5), S. 501–506.
- Lombaerts, M.; van Wezel, T.; Philippo, K.; Dierssen, J. W. F.; Zimmerman, R. M. E.; Oosting, J. et al. (2006): E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. In: *Br J Cancer* 94 (5), S. 661–671.
- Lu X.; Guo H.; Chen X.; Xiao J.; Zou Y.; Wang W.; Chen Q. (2016): Effect of RhoC on the epithelial-mesenchymal transition process induced by TGF- β 1 in lung adenocarcinoma cells. In: *Oncol Rep* 36 (6), S. 3105 -3112
- Lüllmann-Rauch R. (2012): Taschenlehrbuch Histologie; Thieme, Auflage: 4

- Menke, A.; Giehl, K. (2012): Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 524 (1), S. 48–55.
- Nagar, B.; Overduin, M.; Ikura, M.; Rini, J. M. (1996): Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. In: *Nature* 380 (6572), S. 360–364.
- Nieman; Prudoff; Johnson; Wheelock (1999): N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. In: *J Cell Biol.* 147 (3), S. 631-644.
- Nollet, F.; Kools, P.; van Roy, F. (2000): Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. In: *Journal of molecular biology* 299 (3), S. 551–572.
- Noren, N. K.; Arthur, W. T.; Burridge, K. (2003): Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. In: *J Biol Chem* 278 (16), S. 13615–13618.
- Nose, A.; Takeichi, M. (1986): A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. In: *J Cell Biol* 103 (6 Pt 2), S. 2649–2658.
- Ozawa, M.; Engel, J.; Kemler, R. (1990): Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. In: *Cell* 63 (5), S. 1033–1038.
- Parri, M.; Chiarugi, P. (2010): Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. In: *Cell communication and signaling : CCS* 8, S. 23.
- Perez, T. D.; Tamada, M.; Sheetz, M. P.; Nelson, W. J. (2008): Immediate-early signaling induced by E-cadherin engagement and adhesion. In: *J Biol Chem* 283 (8), S. 5014–5022.
- Pertz, O.; Bozic, D.; Koch, A. W.; Fauser, C.; Brancaccio, A.; Engel, J. (1999): A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. In: *EMBO J* 18 (7), S. 1738–1747.
- Ratheesh A.; Gomez G. A.; Priya R.; Verma S.; Kovacs E. M.; Jiang K.; Brown N. H.; Akhmanova A.; Stehbens S. J.; Yap A. S.(2012): Centralspindlin and α -catenin regulate Rho signalling at the epithelial zonula adherens. In: *Nature cell biology* (14), S. 818-828
- Reynolds, A. B. (2010): Exposing p120 catenin's most intimate affair. In: *Cell* 141 (1), S. 20–22.
- Ridley, A. J. (2013): RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. In: *Journal of microscopy* 251 (3), S. 242–249.

- Riethmacher, D.; Brinkmann, V.; Birchmeier, C. (1995): A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (3), S. 855–859.
- Robert Koch-Institut (2016): Bericht um Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
- Rusch, V.; Baselga, J.; Cordon-Cardo, C.; Orazem, J.; Zaman, M.; Hoda, S. et al. (1993): Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. In: *Cancer Res* 53 (10 Suppl), S. 2379–2385.
- Sahai, E.; Marshall, Christopher J. (2002): ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. In: *Nat Cell Biol* 4 (6), S. 408–415.
- Schaefer A.; Reinhard N. R.; Hordjik P. L. (2014): Toward understanding Rho GTPase specificity: structure, function and local activation. In: *Small GTPases* 5 (2), S. 6.
- Seidel B.; Braeg S.; Adler G.; Wedlich D.; Menke A. (2004): E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn isoforms and their ability to suppress invase growth in pancreatic cancer cells. In: *Oncogene* 23 (32), S. 5532-5542.
- Shikada Y.; Yoshino I.; Okamoto T.; Fukuyama S.; Kameyama T.; Maehara Y. (2003): Higher expression of RhoC is related to invasiveness in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.* 9 S. 5282-5286
- Shikada, Y.; Yoshino, I.; Okamoto, T.; Fukuyama, S.; Kameyama, T.; Maehara, Y. (2003): Higher expression of RhoC is related to invasiveness in non-small cell lung carcinoma. In: *Clin Cancer Res* 9 (14), S. 5282–5286.
- Siegel, R. L.; Miller K.D.; Jemal, A. (2016): Cancer statistics, 2016. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 66 (1), S. 7-30.
- Simpson, K. J.; Dugan, A. S.; Mercurio, A. M. (2004): Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma. In: *Cancer Res* 64 (23), S. 8694–8701.
- Smith P. K.; Krohn R. I.; Hermanson G. T.; Mallia A. K.; Gartner F.H.; Provenzano N. D.; Fujimoto E. K.; Goeke N. M.; Olson B. J.; Klenk D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchovivic acid . In: *Analytical Biochemistry* 150 (1), S. 76-85.
- Sunaga N.; Kohno T.; Kolligs F. T.; Fearon E. R.; Saito R.; Yokota J. (2001): Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (beta-catenin) mutations ina subset of human lung adenocarcinoma. In: *Genes Chromosomes Cancer* 30 (3), S. 316-121.

- Takeichi, M. (1991): Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. In: *Science (New York, N.Y.)* 251 (5000), S. 1451–1455.
- The Global Cancer Observatory; International Agency For Research On Cancer (2018): Lung (Internetquelle)
- Travis, W. D. (2011a): Classification of lung cancer. In: *Seminars in roentgenology* 46 (3), S. 178–186.
- Travis, W. D. (2011b): Pathology of lung cancer. In: *Clinics in chest medicine* 32 (4), S. 669–692.
- Travis, W. D.; Brambilla, E.; Muller-Hermelink, H.K.; Harris, C.C. (2004): Pathology and Genetics of Tumors of The Lung, Pleura, Thymus and Heart (IARC WHO-classification of Tumors): World Health Organization
- van Assche, K.; Ferdinande, L.; Lievens, Y.; Vandecasteele, K.; Surmont, V. (2014): EGFR Mutation Positive Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: Treatment Beyond Progression. In: *Front Oncol* 4, S. 350.
- van Golen, K. L.; Wu, Z. F.; Qiao, X. T.; Bao, L.; Merajver, S. D. (2000): RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. In: *Neoplasia* 2 (5), S. 418–425.
- van Roy, F.; Berx, G. (2008): The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (23), S. 3756–3788.
- Vega, F. M.; Colomba, A.; Reymond, N.; Thomas, M.; Ridley, A. J. (2012): RhoB regulates cell migration through altered focal adhesion dynamics. In: *Open biology* 2 (5), S. 120076.
- Viera A. F. and Paredes J. (2015): P-Cadherin and the journey to cancer metastasis In: *Molecular Cancer* (14), S. 178.
- Von Bülow C.; Oliveira-Ferrer L.; Löning T.; Trillisch F.; Mahner S.; Milde-Langosch K. (2015): Cadherin-11 mRNA and protein expression in ovarian tumors of different malignancy: No evidence of oncogenic or tumor-suppressive function. In: *Mol Clin Oncol* 3 (5), S. 1067-1072.
- Wang Y.; Huang L.; Yang Y.; Xu L.; Yang J.; Wu Y. (2013): Effects of autocrine vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung cancer cell line A549. In: *Molecular Biology Reports* 40 (4), S. 3093-3099.
- Wang, W.; Yang, L-Y; Huang, G-W; Lu, W-Q; Yang, Z-L; Yang, J-Q; Liu, H-L (2004): Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in hepatocellular carcinoma with poor prognosis. In: *Br J Cancer* 90 (12), S. 2349–2355.
- Wheeler, Ann P.; Ridley, Anne J. (2004): Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. In: *Exp Cell Res* 301 (1), S. 43–49.

- William D. Travis, Elizabeth Brambilla, H. Konrad Müller-Hermelink, Curtis C. Harris (2004): Pathology and Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.
- Xu, W.; Kimelman, D. (2007): Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. In: *J Cell Sci* 120 (Pt 19), S. 3337–3344.
- Yamada, S.; Nelson, W. J. (2007): Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. In: *J Cell Biol* 178 (3), S. 517–527.
- Yan, G.; Zou, R.; Chen, Z.; Fan, B.; Wang, Z.; Wang, Y. et al. (2014): Silencing RhoA inhibits migration and invasion through Wnt/beta-catenin pathway and growth through cell cycle regulation in human tongue cancer. In: *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 46 (8), S. 682–690.
- Yang, Y.; Chen, M.; Xian, L. (2014): Prognostic and clinicopathological significance of downregulated E-cadherin expression in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): a meta-analysis. In: *PloS one* 9 (6), S. 99763.
- Yao X.; Ireland S. K.; Pham T.; Temple B.; Chen R.; Raj M. H.; Biliran H. (2014): TLE promotes EMT in A549 lung cancer cells through suppression of E-Cadherin. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 455 (3-4), S. 277-284.
- Zhang B.; Zhang H.; Shen G. (2015): MTA2 promotes the metastasis of NSCLC. In *Japanese Journal of Clinical Oncology* 45 (8), S. 755-766.
- Zhang Y.; Zaoh Y.; Jiang G.; Zhang X.; Zhao H.; Wu J.; Xu K.; Wang E. (2014): Impact of p120-catenin Isoforms 1A and 3A on Epithelial Mesenchymal Transition of Lung Cancer Cells Expressing E-cadherin in Different Subcellular Locations. In: *PLoS One* 4,9 (2).

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch ein Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift

9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Andre Menke für die Vergabe des Dissertationsthemas und die erstklassige Betreuung während der praktischen Laborarbeit und dem Verfassen der Dissertation. Ebenfalls danke ich Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl für die Mitbetreuung und Hilfestellungen. Für die angenehme Atmosphäre im Labor und die ständige Hilfsbereitschaft danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie solider Tumore, insbesondere Stephanie Wirth und Sarah Barnard.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, die mich mit schier endloser Geduld jederzeit unterstützt und motiviert hat.