

Die Regulation des E-Cadherin-Adhäsionskomplexes in Lungenkarzinomzelllinien

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

vorgelegt von Schneider, Tobias
aus Kirchen (Sieg)

Gießen 2016

Aus der Professur für Molekulare Onkologie solider Tumore, Zentrum für Innere Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Leitung von Herrn
Prof. Dr. Andre Menke.

Gutachter: Prof. Dr. Andre Menke
Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen
Tag der Disputation: 14.07.2016

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Das Bronchialkarzinom.....	1
1.2 Maligne Tumore	1
1.3 Metastasierung.....	2
1.4 Zell-Zell-Adhäsion	3
1.5 Cadherine.....	3
1.6 E-Cadherin-Catenin-Komplex.....	4
1.7 α -, β - und γ -Catenin.....	6
1.8 P120-Catenin	7
1.9 Epithelial-mesenchymale Transition	8
1.10 Transformierender Wachstumsfaktor β	9
1.11 Fragestellung.....	10
2 Materialien.....	11
2.1 Geräte	11
2.2 Chemikalien	11
2.3 Lösungen und Puffer	12
2.4 Antikörper.....	15
2.5 Acrylamidgele.....	18
2.6 Stimulationsreagenzien für die Zellkultur	18
2.7 Farbreagenzien für Immunfluoreszenz	19
2.8 Molekulargewichtsmarker	19
2.9 Zelllinien	19
2.10 Software	20
3 Methoden	21
3.1 Zellkultur.....	21
3.1 Zelllysatherstellung.....	21

3.3 Proteinbestimmung	22
3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	23
3.5 Antikörperfärbung	24
3.6 Immunpräzipitation	25
3.7 Immunfluoreszenz	26
3.8 Tritonfraktionierung	28
3.9 Aggregationsassay	28
3.10 Wundheilungsassay	29
3.11 Statistische Angaben	30
4 Ergebnisse	31
4.1 Phasenkontrastaufnahmen der verwendeten NSCLC-Zelllinien	31
4.2 Analyse der Cadherine in ausgewählten NSCLC-Zelllinien	31
4.3 Analyse der Catenine in den untersuchten Zelllinien	33
4.4 Phosphorylierung von p120ctn in Adenokarzinomzelllinien der Lunge	35
4.5 Analyse der Lokalisation von E-Cadherin und Catenin in der Zelle	36
4.6 Analyse des Aktinzytoskeletts von Adenokarzinomzelllinien der Lunge	39
4.7 Analyse des E-Cadherin-Catenin-Proteinkomplexes	41
4.8 Assoziation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Zytoskelett	44
4.9 Analyse weiterer Interaktionspartner des E-Cadherin-Catenin-Komplexes	46
4.10 Analyse der Aggregationsfähigkeit von NSCLC	49
4.11 Analyse der Migration von NSCLC-Zellen im Wundheilungsassay	52
5 Diskussion	56
5.1 Die Cadherine in Lungentumorzelllinien	56
5.2 Die Catenine in Lungentumorzelllinien	58
5.3 Der E-Cadherin-Catenin-Komplex in Lungentumorzelllinien	60
5.4 p190-Rho-GAP in Lungentumorzelllinien	63
5.5 Assoziation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Zytoskelett	64
5.6 Auswirkungen von TGF β auf die Migration von Lungentumorzelllinien	65
5.7 Ausblick	67

6 Zusammenfassung.....	68
7 Summary.....	69
8 Anhang.....	70
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	70
8.2 Literaturverzeichnis.....	72
8.3 Veröffentlichungen.....	80
8.4 Ehrenwörtliche Erklärung.....	81
8.5 Danksagung.....	82
8.6 Lebenslauf.....	83

1 Einleitung

1.1 Das Bronchialkarzinom

Das Bronchialkarzinom stellt die zweithäufigste Tumorentität und die häufigste Todesursache in der Gruppe der Malignome dar (Siegel et al. 2015).

Der Begriff Bronchialkarzinom bezeichnet verschiedene Tumore der Lunge, die in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: die kleinzelligen Karzinome (*small cell lung cancer* = SCLC) und die nicht-kleinzelligen Karzinome (*non-small cell lung Cancer* = NSCLC) mit der Gruppe des Adenokarzinoms, des Plattenepithelkarzinoms und des großzelligen Karzinoms. Diese Unterteilung erfolgt anhand morphologischer Kriterien. Mit 85% aller Lungentumoren stellen die NSCLCs die größte Gruppe dar (Cagle et al. 2013, Travis et al. 2013).

Neben der morphologischen Zuordnung hat sich die Möglichkeit zur Ordnung der Tumoren anhand des Nachweises von Leitmutationen etabliert, beispielsweise Veränderungen von *epidermal growth factor receptor (EGFR)*, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)* oder der *anaplastic lymphoma kinase (ALK)*. In Adenokarzinomen der Lunge finden sich Mutationen im *EGFR*-Gen in 23% der Fälle und Mutationen von *KRAS* in 25% der Fälle. Insbesondere bei Nichtrauchern zeigen sich oftmals Veränderungen von *EGFR* und *ALK*, Raucher dagegen zeigen höhere Mutationsraten von *KRAS* und *fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)* (Yu und He 2013, Gadgeel 2013). Die Mutationsanalyse verschiedener Gene erlaubt zudem eine prognostische Vorhersage der zu erwartenden Lebenszeit, die Wahl einer zielgerichteten Therapie und die Einschätzung der Erfolgsaussichten einer onkologischen Behandlung (Chen et al. 2007, Wood et al. 2015).

1.2 Maligne Tumore

Das Bronchialkarzinom gehört zur Gruppe der malignen Tumoren. Mit dem Begriff Tumor wird eine Gewebsschwellung unterschiedlichster Genese bezeichnet. Entsteht diese Schwellung aufgrund einer Zellmasse, welche autonom proliferiert und nicht mehr der physiologischen Wachstumsregulation unterworfen ist, sollte in diesem Zusammenhang der Begriff Neoplasie verwendet werden. Neoplasien werden in gutartige (benigne) und bösartige (maligne) Prozesse unterteilt. Gutartige Tumoren sind gut differenziert, zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu ihrem Ursprungsgewebe. Sie wachsen meist langsam und zeigen kein invasives, sondern nur ein verdrängendes Verhalten gegenüber dem Ursprungsgewebe. Des Weiteren bilden sie keine Tochtergeschwulste (Metastasen). Benigne Tumoren, die aus Epithelzellen hervorgehen, werden als Adenome bezeichnet,

solche aus Bindegewebszellen, als Fibrome. Bösartige Tumoren weisen einen niedrigen Differenzierungsgrad auf, also eine geringere Ähnlichkeit mit dem Ursprungsgewebe (Krams et al. 2010) und zeigen verschiedenste Malignitätskriterien wie z.B. vermehrte Unterdrückung von Signalen, welche die Proliferation hemmen, Resistenz gegenüber Apoptose, Angiogenesefähigkeit, Möglichkeit zur Invasion und Metastasierung, Veränderungen im Energiestoffwechsel und Beeinflussung der Immunabwehr (Hanahan und Weinberg 2011). In über 90% der Fälle entstehen diese malignen Tumoren, zu denen auch das Bronchialkarzinom gehört, aus Epithelzellen und werden dann als Karzinome oder, mit Drüsenanteil, als Adenokarzinome bezeichnet (Christiansen und Rajasekaran 2006, Krams et al. 2010).

1.3 Metastasierung

Die Metastasierung von bösartigen Tumoren verschlechtert die Prognose der erkrankten Patienten und stellt mit ihren Folgen die Haupttodesursache dieser Personen dar (Cavallaro und Christofori 2004). Im Falle des Bronchialkarzinoms verringert eine stattgefundene Metastasierung die 5-Jahres-Überlebensrate zum Zeitpunkt der Diagnosestellung von 52,2% auf 3,7% (Hall et al. 2013).

Es sind mehrere Schritte notwendig, damit es zur Metastasierung eines Tumors kommen kann. Tumore benötigen bei zunehmendem Durchmesser der primären Geschwulst Blutgefäße für ihr weiteres Wachstum. Die Versorgung mit Nährstoffen erfolgt durch die Bereitstellung neuer Gefäße, welche von einigen Tumoren mittels Angiogenese induziert werden. Diese Gefäße und die vorhandenen Lymphgefäße können dem Tumor als Weg in die Blutzirkulation dienen und damit die Metastasierung ermöglichen. Im Blutgefäßsystem müssen die Tumorzellen in der Lage sein zu überleben, bis sie sich im Kapillarbett eines Organes niederlassen. Nach Verlassen der Gefäße können Tumorzellen eine Tochtergeschwulst bilden. Der Großteil der metastasierten Zellen geht jedoch zu Grunde oder verharrt in einem Stadium von lediglich mikroskopisch nachweisbaren Metastasen, in denen sich Zellteilung und Apoptose die Waage halten, so dass es nicht zu einer Progression der Erkrankung kommt. Lediglich ein kleiner Teil der metastasierten Tumorzellen führt zu einer Progression der Erkrankung (Fidler 2003, Chambers et al. 2002, Gupta und Massagué 2006, Reymond et al. 2013).

Ein initialer Schritt der Metastasierung stellt die Auflösung der Zell-Zell-Adhäsion im Primärtumor dar. Dies ermöglicht das Lösen der Zelle aus dem Zellverband und gemeinsam mit Veränderungen des Zytoskeletts und dem Auflösen der Basalmembran die Invasion von Zellen ins Blutgefäßsystem (Gupta und Massagué 2006).

1.4 Zell-Zell-Adhäsion

Zellen nehmen durch verschiedene Gruppen von Proteinkomplexen Kontakt miteinander auf. Kanalbildende Strukturen (*Gap Junctions*) ermöglichen den Stoffaustausch zwischen den Zellen. Undurchlässige Barrieren (*Tight Junctions*) begrenzen den Zellzwischenraum und verhindern eine unregelte Diffusion. Adhäsionsverbindungen (*Adherens Junctions*), in welchem Cadherine nachgewiesen werden können, leisten einen Beitrag zur mechanischen Stabilität der Zellen untereinander durch Kopplung des Zytoskeletts der einzelnen Zellen (Alberts et al. 2011). Abbildung 1 stellt die genannten Kontaktstrukturen und weitere Adhäsionsverbindungen schematisch dar.

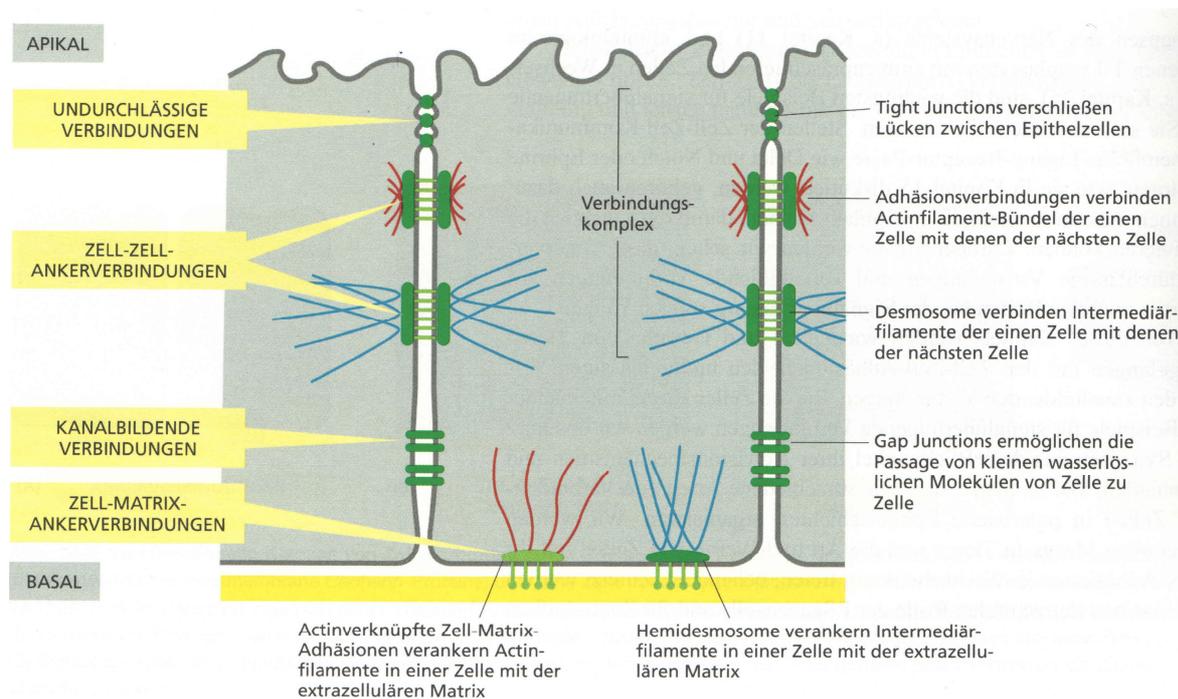


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der verschiedenen Adhäsionsmoleküle der Zelle.

Im apikalen Bereich der Zelle finden sich undurchlässige Barrieren, die sogenannten *Tight Junctions*. Weiter basalwärts wird die Adhäsion durch Zell-Zell-Ankerverbindungen mit Assoziationen zum Aktinzytoskelett und zum Intermediärfilamentsystem vermittelt. Cadherine finden sich im Bereich der aktinassoziierten Ankerverbindungen (*Adherens Junctions*). Die Passage von kleineren Molekülen zwischen den Zellen wird durch die basal gelegenen *Gap Junctions* ermöglicht. Die Verankerung der Zelle mit der extrazellulären Matrix ist durch Hemidesmosomen und aktinverknüpfte Zell-Matrix-Adhäsionen gewährleistet. Nach Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Schäfer [Hg.], 2011, *Molekularbiologie der Zelle*, Seite 1282, Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

1.5 Cadherine

Insbesondere die cadherinvermittelte Adhäsion ist für den Zusammenhalt epithelialen Gewebe unabdingbar. Die Gruppe der Cadherine enthält verschiedene Unterfamilien: die klassischen Cadherine (Typ 1), die atypischen Cadherine (Typ 2), desmosomale Cadherine mit den Desmocollinen und Desmogleinen, Protocadherine und die Flamingo-Cadherine. Die klassischen Cadherine, zu denen E-, N- und P-Cadherin gehören, und die atypischen Cadherine haben fünf extrazelluläre Domänen (EC-Domänen) in β -

Faltblattstruktur. Die klassischen Cadherine unterscheiden sich von den atypischen Cadherinen dahingehend, dass die klassischen Cadherine in ihrer ersten EC-Domäne (EC-1) ein Histidin-Alanin-Valin-Motiv haben. Die EC-1 ist entscheidend für die homophile Interaktion der Cadherine mit den Cadherinen der Nachbarzelle (Nollet et al. 2000, Wheelock und Johnson 2003). Diese Verbindung der Cadherine untereinander ist nur in Anwesenheit von Calciumionen möglich (Yoshida-Noro et al. 1984, Wheelock und Johnson 2003) und wird als trans-Dimerisierung bezeichnet (Fichtner et al. 2014).

Cadherine sind essentiell für die Aufrechterhaltung und Bildung der Zellpolarität. Die Deletion von Cadherinen in Mausembryonen führt unmittelbar zum Tod, da die unterschiedliche Cadherin-Oberflächenexpression eine Sortierungsfunktion im Rahmen der Embryogenese übernimmt. So verteilen sich beispielsweise Melanoblasten in der Dermis, der Epidermis und in den Haarfollikeln über unterschiedliche Expression von E- und P-Cadherin (Wheelock und Johnson 2003).

E-Cadherin findet sich in Adhäsionsverbindungen von Epithelien z.B. des Alveolarepithels (Alberts et al. 2011, Smythe et al. 1999). In Tumoren ist dagegen teilweise ein Verlust von E-Cadherin nachweisbar. Die Deletion von E-Cadherin ist in NSCLC-Tumoren als Korrelat zu einer erhöhten Anzahl an Gehirnmetastasen (Yoo et al. 2012), einer erhöhten Invasion in die Pleura, einer verringerten Überlebenszeit der betroffenen Patienten und eines erhöhten TNM-Stadiums nachgewiesen (Kim et al. 2013). Auch in anderen epithelialen Tumoren können Veränderungen von Cadherinen nachgewiesen werden. E-Cadherin ist oftmals supprimiert und andere klassische Cadherine wie N-, oder P-Cadherin werden verstärkt exprimiert (Cavallaro und Christofori 2004). Aber nicht nur klassische Cadherine, sondern auch atypische wie Cadherin-11/OB-Cadherin, finden sich im erhöhten Maße in malignen Tumoren (Nollet et al. 2000). Zudem geht in β -Zelladenomen des Pankreas der Verlust von E-Cadherin mit einer Progression des gutartigen Adenom zum bösartigen Karzinom einher (Perl et al. 1998). In Zellkulturversuchen kann die Invasivität von Tumoren dagegen durch die Reexpression von E-Cadherin wieder verringert werden (Cavallaro und Christofori 2004, Vleminckx et al. 1991).

1.6 E-Cadherin-Catenin-Komplex

E-Cadherin liegt in der Zelle in Assoziation mit intrazellulären Proteinen vor. Ein Teil dieser Proteine, die im Komplex mit E-Cadherin gefunden werden können, werden als Catenine bezeichnet. Die Catenine binden an verschiedenen Domänen an das E-Cadherin-Molekül. Einerseits binden β - oder γ -Catenin an die Catenin-Bindungs-Domäne, andererseits bindet p120-Catenin (p120ctn) im Bereich der Juxta-Membran-Domäne an E-Cadherin (Aghib und McCreas 1995, Anastasiadis und Reynolds 2000).

β - und γ -Catenin stellen über ein weiteres Catenin, α -Catenin, und eventuell weitere Proteine, die Verbindung zum Aktinzytoskelett her (Desai et al. 2013, Yamada et al. 2005).

Die Verbindung von E-Cadherin und β -Catenin wird bereits im endoplasmatischen Retikulum realisiert, die Bindung an das Aktinzytoskelett über α -Catenin dagegen erst nach Eintreffen des Komplexes an der Plasmamembran (Jamora und Fuchs 2002). P120ctn, als Bindungspartner an der Juxta-Membran-Domäne, ist in die Regulation der Adhäsion involviert und schützt E-Cadherin vor Degradation (Davis et al. 2003, Wheelock et al. 2008). Für p120ctn wurde in Verbindung mit C-Cadherin, einem anderen klassischen Cadherin, nachgewiesen, dass es durch Förderung des *lateral clustering*, der Akkumulation von mehreren Cadherinen an einem Punkt in der Zellmembran, die schwache Adhäsion einer einzelnen Cadherinadhäsion in eine verstärkte Adhäsion der Gesamtzelle überführt (Yap et al. 1998). Im Zellversuch bewirkt die Abkopplung des p120ctn-Moleküls vom E-Cadherin-Catenin-Komplex eine Verringerung der Adhäsion und Aggregation (Anastasiadis und Reynolds 2000). P120ctn reguliert zudem über die Bindung an Kinesin die Zelloberflächenlokalisierung der Cadherine (van Hengel und van Roy 2007). Abbildung 2 stellt den Aufbau des E-Cadherin-Catenin-Komplexes schematisch dar.

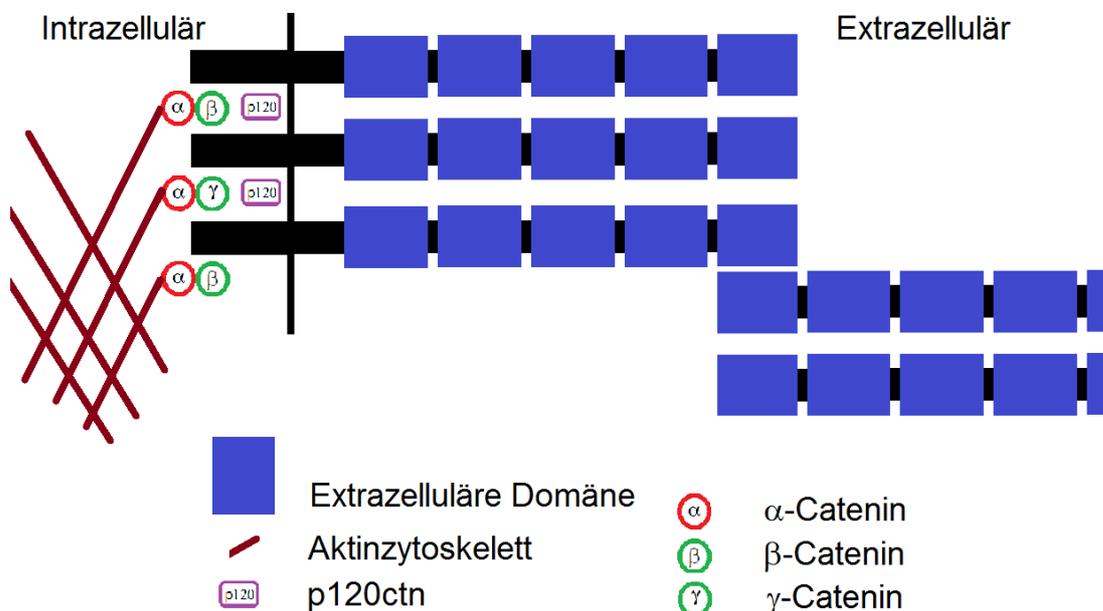


Abbildung 2: Überblick über den Aufbau des E-Cadherin-Catenin-Komplexes.

E-Cadherin bindet im Bereich der ersten extrazellulären Domäne mit einem E-Cadherin-Molekül der Nachbarzelle. Diese Bindung ist nur in Anwesenheit von Calcium möglich. Intrazellulär binden β - oder γ -Catenin über die Catenin-Bindungs-Domäne an E-Cadherin und verbinden den entstandenen Komplex über α -Catenin mit dem Aktinzytoskelett. P120ctn bindet im Bereich der Juxta-Membran-Domäne an E-Cadherin und stabilisiert den Komplex.

1.7 α -, β - und γ -Catenin

E-Cadherin ist indirekt über β -Catenin oder γ -Catenin mit α -Catenin verbunden. α -Catenin seinerseits verbindet die genannten Bestandteile mit dem Aktinzytoskelett. Das α -Catenin-Molekül besteht aus fünf α -Helices mit dazwischenliegenden Verbindungsregionen. α -Helix 1 und 2 bilden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Vinculin die Vinculin-Homologie-Region 1 (VH1). Helix 3 und 4 bilden die VH2, Helix 5 die VH3 (Desai et al. 2013, Hartsock und Nelson 2008). VH1 ist als β -Catenin-Bindungsdomäne beschrieben und erlaubt gleichzeitig die Homodimerisierung von α -Catenin. VH2 stabilisiert die Bindung an den Cadherinkomplex, VH3 bindet Aktin (Desai et al. 2013).

Der direkte Nachweis eines Komplexes bestehend aus Aktin, α -Catenin, β - oder γ -Catenin und E-Cadherin *in vivo* steht bisher aus (Yamada et al. 2005). Desai et al. (2013) konnten allerdings zeigen, dass in Zellen monomeres und dimeres α -Catenin gleichzeitig vorhanden ist und monomeres α -Catenin, welches an E-Cadherin gebunden ist, die Adhäsion von Zellen stärkt. Dimerisiertes α -Catenin ohne Verbindung zu E-Cadherin wirkt sich dagegen negativ auf die Adhäsion aus und erfüllt eine Funktion in der Modulation des Aktinzytoskeletts.

β -Catenin zeichnet sich als ein Protein der Cateninfamilie durch 12 Armadillodomänen in α -helikaler Formation mit jeweils ca. 42 Aminosäuren aus (Hartsock und Nelson 2008, Xing et al. 2008). Im Bereich der Armadillomotive findet die Interaktion mit E-Cadherin im E-Cadherin-Catenin-Komplex statt. Zudem kann dieser Bereich des β -Catenins mit anderen Interaktionspartnern in Wechselwirkung treten wie beispielsweise EGFR (Hoschuetzky et al. 1994). Der N-terminale Bereich außerhalb der Armadillodomänen ist einer Modulation durch Phosphorylierung z.B. mittels der Glykogensynthasekinase-3- β (GSK3 β) zugänglich (Huber et al. 1997). Diese Phosphorylierung leitet die Ubiquitinierung des β -Catenin-Moleküls ein und in der Folge den Abbau dieses Proteins (Xing et al. 2008). Neben der beschriebenen regulatorischen Funktion, ermöglicht der N-Terminus von β -Catenin die Bindung an α -Catenin und damit indirekt die Bindung an das Aktinzytoskelett (Desai et al. 2013). Die Funktion von β -Catenin kann von der Aktivität verschiedener Tyrosinkinassen wie den Rezeptortyrosinkinassen EGFR oder FGFR sowie durch nicht-Rezeptortyrosinkinassen wie *cellular sarcoma* (c-Src) beeinflusst werden. Eine Phosphorylierung bewirkt eine Destabilisierung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes und in der Folge eine verringerte Adhäsion und eine erhöhte Mobilität der Zelle (Cavallaro und Christofori 2004, Fujita et al. 2002).

Des Weiteren ist β -Catenin in einigen Zellarten im Zytoplasma und Kern nachweisbar und stellt ein Schlüsselmolekül des Wnt-Signalweges (*wingless-type MMTTV integration site*

family member) dar. Zytosolisches β -Catenin wird ohne Wnt-Stimulation durch einen Komplex aus GSK3 β , Axin (*axis inhibition protein*) und dem Adenomatous-polyposis-coli-Protein (APC) phosphoryliert, in der Folge ubiquitiniert und aufgrund dessen der proteasomalen Degradation zugeführt. Der aktivierte Wnt-Signalweg unterdrückt die Aktivität der GSK3 β , die nun nicht mehr in der Lage ist β -Catenin zu phosphorylieren. Stabilisiertes β -Catenin kann in den Zellkern transportiert werden und in Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren die Genexpression beeinflussen (Jeanes et al. 2008). Der Wnt-Signalweg ist mit weiteren Regulationsmechanismen der Zelle verbunden, zum Beispiel mit dem TGF β -Signalweg (*transforming growth factor β* , transformierender Wachstumsfaktor β) (Polakis 2000) oder mit der Proteinkinase B (PKB), welche ebenfalls die GSK3 β phosphorylieren und damit deaktivieren kann (Jeanes et al. 2008).

γ -Catenin zeigt in seiner Aminosäuresequenz eine 65%ige Ähnlichkeit zu β -Catenin auf und ist ebenso im E-Cadherin-Catenin-Komplex nachweisbar und stellt dort über α -Catenin die Verbindung an das Aktinzytoskelett her (Adams et al. 1996, Cavallaro und Christofori 2004). Trotz der Ähnlichkeit beider Moleküle und der ähnlichen Funktion in der Zell-Zell-Adhäsion haben sich in der Literatur Unterschiede herauskristallisiert. β -Catenin induziert verstärkt die Bildung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes, γ -Catenin dagegen erhält diesen Komplex aufrecht (Adams et al. 1996). Zudem findet sich γ -Catenin auch in desmosomalen Haftstrukturen, in denen β -Catenin nicht nachweisbar ist (Zhurinsky et al. 2000).

Die verringerte Expression von α -Catenin, β -Catenin und γ -Catenin korreliert mit einer erhöhten Invasivität, Metastasierung und einer schlechteren Differenzierung von NSCLC-Tumoren (Bremnes et al. 2002b, Kim et al. 2013).

1.8 P120-Catenin

P120ctn wurde ursprünglich als Substrat der Kinase Src identifiziert und als p120cas (Cadherin-assoziiertes Src-Substrat) deklariert. P120ctn weist zehn Armadillodomänen auf, von denen die Domänen 1-5 und 7 essentiell für die Bindung an E-Cadherin im Bereich der Juxta-Membran-Domäne sind (Ireton et al. 2002, Anastasiadis und Reynolds 2000). Durch unterschiedliche Splicevarianten und vier verschiedene Startcodons sind 48 unterschiedliche p120ctn-Isoformen möglich, von denen allerdings nur ein Teil beschrieben ist (van Hengel und van Roy 2007, Reynolds und Rocznik-Ferguson 2004). Die Bindung von p120ctn an E-Cadherin stabilisiert den E-Cadherin-Catenin-Komplex und erhöht die Halbwertszeit dieses Komplexes an der Membran (Fukumoto et al. 2008). In Abwesenheit von p120ctn werden sowohl Cadherine als auch α - und β -Catenin verstärkt degradiert (Davis et al. 2003). Zellen, welche zwar einen Adhäsionskomplex mit

Verbindung zum Aktinzytoskelett bilden, allerdings kein p120ctn in Verbindung mit E-Cadherin haben, zeigen eine abgeschwächte Zell-Zell-Adhäsion (Thoreson et al. 2000). Die Funktion von p120ctn in verschiedenen Zellsystemen wird zudem durch Phosphorylierung reguliert (Hong et al. 2016).

In verschiedenen Tumoren z.B. des Dickdarms, der Prostata oder der Harnblase ist eine Verringerung von p120ctn nachweisbar (Thoreson und Reynolds 2002). Auch NSCLC-Tumoren zeigen eine verringerte Expression von p120ctn (Bremnes et al. 2002a) und es lässt sich oftmals eine zytosolische Lokalisation dieses Proteins finden. Diese Lokalisation korreliert mit einem fortgeschrittenen TNM-Stadium und einer schlechten Differenzierung der Tumoren (Wang et al. 2006).

1.9 Epithelial-mesenchymale Transition

Sowohl die E-Cadherin-abhängige Adhäsion, als auch die durch das Aktinzytoskelett gesteuerte Migration und Invasion spielen in der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) eine Rolle (Thiery 2002). Die EMT stellt einen Grundprozess des Lebens dar. In der embryologischen Entwicklung wandeln sich epitheliale Zellen der Keimblätter in mesenchymale embryonale Zellen um. Es kommt in den epithelialen Zellen zu einem Verlust der Zellpolarität, ausgelöst durch den Abbau von Zell-Zell-Verbindungen, zum Umbau des Zytoskelettes und zur Veränderung der Lokalisation der Zellorganellen. Die dabei entstandenen Zellen ähneln mesenchymalen Zellen und zeigen die Fähigkeit in die umgebende extrazelluläre Matrix zu wandern und neue Kolonien von Zellen zu bilden. Die E-Cadherin-abhängige Adhäsion wird in diesem Prozess herunterreguliert, während mesenchymale Eigenschaften wie Aktinstressfasern in den Zellen verstärkt werden (Thiery 2003, Lamouille et al. 2014). In Tumorzellen wird dieser Prozess zum Teil reaktiviert. Bei der Progression von Tumorzellen wird der oben beschriebene Verlust der E-Cadherin-abhängigen Adhäsion als zentrales Element angesehen (Thiery 2002, Christiansen und Rajasekaran 2006).

Im Rahmen der EMT kann es in Tumoren zu einer Veränderung der Expression von Cadherinen kommen. Dieser Prozess wird als *Cadherin-Switch* bezeichnet und kann zum Verlust von E-Cadherin und zum Hinzugewinn anderer Cadherine wie N-, P- oder Cadherin-11 führen (Wheelock et al. 2008).

Auch das Aktinzytoskelett erfährt charakteristische Umwandlungen während der EMT. Zirkumferentes Aktin wandelt sich in Aktinstressfasern um (Maeda et al. 2005, Wheelock et al. 2008), unter anderem durch die Aktivierung von RhoA (Thiery 2002), und es bildet sich eine fibroblastenähnliche Morphologie (Saito et al. 2009).

Die EMT läuft bei Tumorzellen nicht immer vollständig ab. Es sind Zwischenstufen zwischen einem epithelialen und einem mesenchymalen Zelltyp beschrieben worden,

welche sich zum Beispiel durch die Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin und Matrix-Metallo-Proteinasen, aber auch epithelialen Markern wie E-Cadherin und Keratin auszeichnen (van Hengel und van Roy 2007, Thiery et al. 2009).

Zellen können durch mehrere Signale zur EMT angeregt werden. Beispielhaft zu nennen ist die Stimulation mit *hepatocyte growth factor* (HGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *insulin-like growth factor* (IGF) oder *transforming growth factor- β* (transformierender Wachstumsfaktor- β , TGF β) (Thiery 2003, Morali et al. 2001, Yang et al. 2015). Auf Letzteren soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

1.10 Transformierender Wachstumsfaktor β

Mittels TGF β lässt sich in mehreren Zellsystemen eine EMT auslösen (Thiery 2003, Xu et al. 2009, Lamouille et al. 2014).

TGF β kann in verschiedenen Tumoren zum einen mittels autokriner Stimulation, durch die Tumorzellen selbst (Saito et al. 2009, Nasarre et al. 2013), zum anderen mittels parakriner Stimulation durch umgebende Fibroblasten auf die Tumorzellen wirken (Yu et al. 2013).

Auf molekularer Ebene interagiert TGF β mit den TGF β -Rezeptoren 1 und 2, welche in der Folge einen Komplex bilden. Der TGF β -Rezeptor 2 ist in der Lage den TGF β -Rezeptor 1 an Serin/Threonin-Resten zu phosphorylieren. Nachgeschaltet werden SMAD-Proteine aktiviert. Rezeptorregulierte-SMADs (R-SMADs) können mit Co-SMAD/SMAD4 einen Komplex bilden und in den Nukleus translozieren und dort mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagieren, wie zum Beispiel Snail 1, Snail 2 oder Twist (Ikushima und Miyazono 2010, Principe et al. 2014). Die Transkriptionsfaktoren induzieren eine verringerte E-Cadherin-Expression und eine erhöhte Expression von N-Cadherin (Villarejo et al. 2014, Xu et al. 2009, Wheelock et al. 2008).

Es existiert zudem die Möglichkeit der Umgehung der SMAD-Proteine im Rahmen einer TGF β -Stimulation über die Signalmoleküle *Rat sarcoma* (Ras), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase B (PKB) (Zhang 2009, Xu et al. 2009). Janda et al. (2002) konnten zeigen, dass eine Stimulation mit TGF β zum Verlust von E-Cadherin durch Beeinflussung des ERK-Signalweges führt. Vogelmann et al. (2005) zeigten dagegen, dass der E-Cadherin-Catenin-Komplex PI3K-abhängig unter TGF β -Einfluss durch Phosphorylierung von α -Catenin und β -Catenin destabilisiert wird.

In Lungentumoren sind sowohl SMAD-abhängige als auch SMAD-unabhängige Einflüsse auf die TGF β -vermittelte EMT beschrieben worden (Yang et al. 2015, Nakashima et al. 2012, Saito et al. 2009, Chen et al. 2012).

1.11 Fragestellung

Die Zell-Zell-Adhäsion, gewährleistet durch E-Cadherin, leistet einen wichtigen Beitrag zur Integrität von epithelialen Geweben. In vielen Tumoren kommt es zu einem Verlust des E-Cadherin-Moleküls und interagierender Proteine. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass dies auch in Lungentumoren der Fall ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Lungenkarzinomzelllinien auf das Vorhandensein von Cadherinen und Catenin zu untersuchen und den Aufbau eines eventuell vorhandenen E-Cadherin-Catenin-Komplexes zu analysieren. Zudem gilt es weitere Interaktionspartner dieses Proteinkomplexes nachzuweisen. Dieser Komplex soll zudem auf seine Bedeutung bezüglich der Adhäsion untersucht werden. Des Weiteren soll geklärt werden, welchen regulatorischen Einfluss erhöhte TGF β -Konzentrationen auf den E-Cadherin-Catenin-Komplex und die Migrations- und Aggregationsfähigkeit in Lungenkarzinomzelllinien haben.

2 Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerätetyp	Firma	Produkt
Absorptions-Reader	BioTek Instruments (Friedrichshall, Deutschland)	ELx800
Inversmikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)	Axiovert 25
Immunfluoreszenzmikroskop	Olympus (Shinjuku, Japan)	IX81
Sicherheitswerkbank	INTEGRA Biosciences (Fernwald, Deutschland)	Labgard
Infrarotfluoreszenzdetektionssystem	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)	Odyssey SA
Chemilumineszenz- Detektionssystem	Vilber Lourmat (Marne-la-Vallée, Frankreich)	Fusion-SL
Mikroliterzentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	5417C
Kühlzentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	5415R
Zellkulturzentrifuge	Heraeus (Hamburg, Deutschland)	Labofuge 400

2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland), Merck Millipore (Billerica, USA) oder VWR International (Darmstadt, Deutschland) in der höchsten erhältlichen Reinheit bezogen.

2.3 Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurde ultrareines Wasser (TKA, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)) als Lösungsmittel verwendet und die pH-Werte mittels Salzsäure (HCl) und Natriumhydroxid (NaOH) eingestellt.

Die Lösungen und Puffer wurden nach etablierten Protokollen der Arbeitsgruppe erstellt:

CMF-PBS		1x Lösung
140 mM	NaCl	pH-Einstellung auf 7,4
2,7 mM	KCl	
10 mM	Na ₂ HPO ₄	
10 mM	KH ₂ PO ₄	
Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung		1x Lösung
10,0% (V/V)	Essigsäure	
25,0% (V/V)	Isopropanol	
0,25 g/l	Coomassie Brilliant Blau R (Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) #27816)	
Coomassie-Brilliant-Blau-Entfärbelösung		
10,0% (V/V)	Essigsäure	1x Lösung
12,5% (V/V)	Isopropanol	
77,5% (V/V)	Wasser	
Elvanol-Eindecklösung		in CMF-PBS
15% (W/V)	Polyvinylalkohol	
1% (W/V)	Natriumazid	
30% (V/V)	Glycerin	
Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer)		1x Lösung
50 mM	Tris	pH-Einstellung auf 7,6
150 mM	NaCl	
0,5% (V/V)	Triton X-100	
0,5% (V/V)	NP40	
IP-Waschpuffer (IP-Wasch)		1x Lösung
50 mM	Tris	pH-Einstellung auf 8,0
200 mM	NaCl	

0,5% (V/V) Triton X-100
1,0% (V/V) NP40
0,1% (V/V) Natriumdeoxycholat

Laufpuffer-SDS-Gele 1x Lösung
50 mM Tris pH-Einstellung auf 8,5
384 mM Glyzin
0,1% (M/V) SDS

Lysispuffer-HEPES 1x Lösung
20 mM HEPES pH-Einstellung auf 7,4
8,6% (M/V) Saccharose

Lysispuffer-NOP 1x Lösung
10 mM Tris pH-Einstellung auf 7,4
150 mM NaCl
1,0% (V/V) NP40
0,5% (V/V) Triton X-100

Lysispuffer-p120 (Thoreson et al. 2000) 1x Lösung
50 mM Tris pH-Einstellung auf 7,4
150 mM NaCl
0,5% (V/V) NP40

Lysispuffer-RIPA 1x Lösung
150 mM NaCl pH-Einstellung auf 7,2
50 mM Tris
1,0% (V/V) Triton X-100
1,0% (V/V) Natriumdeoxycholat
0,2% (M/V) SDS
20 mM EDTA
20 mM EGTA

Phosphataseinhibitor

PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail (Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz))

Ponceaurot-Färbelösung

0,15% (M/V) Ponceau S
5% (V/V) Essigsäure
In Wasser gelöst

Probenpuffer-Laemmli modifiziert nach Laemmli (1970) 4x Lösung

2% (M/V) SDS
10% (V/V) Glycerin
5% (V/V) β -Merkaptoethanol
0,2% (M/V) Bromphenolblau

Probenpuffer-SDS

5x Lösung in TRIS 0,2M pH 8,8

1 M Saccharose
5 mM EDTA
0,2% (M/V) Bromphenolblau

Vor Verwendung erfolgte die Zugabe von 1/6 (V/V) 10%iger SDS-Lösung und einer Spatelspitze DTT.

Proteaseinhibitor

1x Lösung gelöst in Tris pH 7,2

10 μ M Pefabloc
10 nM Aprotinin
21 nM Leupeptin
50 nM Soybean Trypsininhibitor (STI)

TBS

1x Lösung

10 mM Tris
150 mM NaCl
pH-Einstellung auf 7,4

Transferpuffer

1x Lösung

25 mM Tris
200 mM Glyzin
0,1% (M/V) SDS
20% (V/V) Methanol

Tritonfraktionierungspuffer

1x Lösung

1% (V/V) Triton X-100
pH-Einstellung auf 7,4

50 mM	HEPES
10 mM	MgCl ₂
200 mM	NaCl

Zellkulturmedium	DMEM (Life Technologies (Carlsbad, USA) #41965-039)
10% (V/V)	Fötale Kälberserum (PAA Lab (Pasching, Österreich) #A15-101)
1% (V/V)	Glutamax (Life Technologies, #35050-038)
1% (V/V)	Nichtessentielle Aminosäuren (Life Technologies, #11140-035)

Vor Verwendung in der Zellkultur wurde das Zellkulturmedium mittels Sterilfilter (Merck Millipore (Billerica, USA) 0,22 µm Porenweite, #SCGPU05RE) filtriert.

2.4 Antikörper

Tabelle 2: Primäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz

Anti-X	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
β-Aktin	Maus	WB: 1:2000	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	#A-5441
Cadherin-E	Maus	WB: 1:4000 IF 1:200	Becton Dickinson Biosciences (San José, USA)	#610182
Cadherin-E	Kaninchen	WB 1:4000 IF: 1:500	Merck Millipore (Billerica, USA)	#04-1103
Cadherin-N	Maus	WB: 1:2000 IF: 1:100	Becton Dickinson Biosciences (San José, USA)	#610921
Cadherin-N	Kaninchen	WB: 1:500 IF: 1:50	Takara Bio Inc. (Otsu, Japan)	#M142
Cadherin-P	Maus	WB: 1:2000 IF: 1:100	Epitomics Abcam (Burlingame, USA)	#Ab19350
Cadherin-11	Kaninchen	1:250 1:50	United States Biological (Salem, USA)	#C0107-08
Catenin-α	Maus	WB 1:1000 IF: 1:50	Becton Dickinson Biosciences (San José, USA)	#610194

Anti-X	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Catenin- α	Kaninchen	WB 1:5000 IF: 1:500	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	#C2081
Catenin- β	Maus	WB: 1:2000 IF: 1:50	Becton Dickinson Biosciences (San José, USA)	#610153
Catenin- β	Kaninchen	WB: 1:5000 IF: 1:500	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	#C2206
Catenin- γ	Maus	WB: 1:4000 IF: 1:200	Becton Dickinson Biosciences (San José, USA)	#610253
Catenin-p120	Maus	WB: 1:1000 IF1:100	Becton Dickinson Biosciences (San José, USA)	#610134
Catenin-p120	Kaninchen	WB: 1:1500 IF: 1:150	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	#Sc-1101
EGFR	Kaninchen	WB: 1:1000 IF: 1:100	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	#Sc-03
FGFR1	Kaninchen	WB: 1:1000	Cell Signaling Technology (Cambridge, Großbritannien)	#3472
FGFR1	Kaninchen	WB 1:500	Biomol (Hamburg, Deutschland)	#06-177
GAPDH	Kaninchen	WB 1:5000 IF: 1:500	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	#Sc-25778
IGFR1 β	Kaninchen	WB: 1:1000 IF: 150	Cell Signaling Technology (Bervery, USA)	#3027
p190-Rho-GAP	Maus	WB 1:1000 IF: 1:100	Becton Dickinson Biosciences (San José, USA)	#610150

Anti-X	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Phospho-Y96 p120-Catenin	Maus	WB: 1:1000	Becton Dickinson Biosciences (San José, USA)	#612534
Phospho-Y228 p120-Catenin	Maus	WB: 1:5000	Becton Dickinson Biosciences (San José, USA)	#612536
Phospho-Y280 p120-Catenin	Maus	WB: 1:250	Becton Dickinson Biosciences (San José, USA)	#612538
Phospho-Y291 p120-Catenin	Maus	WB 1:500	Becton Dickinson Biosciences (San José, USA)	#612690

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper für Western Blot

Ziel	Mechanismus	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Anti-Maus	HRP-gekoppelt	WB: 1:5000	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)	#7076
Anti-Kaninchen	HRP-gekoppelt	WB:1:5000	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)	#7074
Anti-Maus	680/700 nm Infrarotdarstellung	WB: 1:100000	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)	#926-32220
Anti-Kaninchen	680/700 nm Infrarotdarstellung	WB: 1:100000	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)	#926-32221
Anti-Maus	770/795 nm Infrarotdarstellung	WB: 1:100000	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)	#926-32210
Anti-Kaninchen	770/795 nm Infrarotdarstellung	WB: 1:100000	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)	#926-32211

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Ziel	Mechanismus	Verdünnung	Hersteller	Nummer
Anti-Maus	Alexa488	1:2000	Molecular Probes (Eugene, USA)	#A-11001
Anti-Maus	Cy3	1:2000	Dianova (Hamburg, Deutschland)	#115-165- 003
Anti-Kaninchen	Alexa488	1:2000	Molecular Probes (Eugene, USA)	#A-11008
Anti-Kaninchen	Cy3	1:2000	Dianova (Hamburg, Deutschland)	#111-166- 045

2.5 Acrylamidgele

Tabelle 5: Zusammensetzung der Acrylamidgele

Grundsubstanz	Trenngel 7,5%	Trenngel 8,5%	Trenngel 10%	Sammelgel
30% (M/V) Acrylamid	2 ml	2,3 ml	2,6 ml	0,38 ml
2% (M/V) Bisacrylamid	0,8 ml	0,9 ml	1,0 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% (M/V) SDS	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml	0,03 ml
60% (M/V) Saccharose	-	-	-	0,75 ml
H ₂ O	4,1 ml	3,6 ml	3,2 ml	1,3 ml
TEMED	8,0 µl	8,0 µl	8,0 µl	4,0 µl
10% (M/V) APS	50 µl	50 µl	50 µl	40 µl

2.6 Stimulationsreagenzien für die Zellkultur

Tabelle 6: Stimulationsreagenzien

Substanz	Hersteller	Bestellnummer	Konzentration Stammlösung
EGF	PeproTech (Rocky Hill, USA)	#AF-100-15	10 ng/µl

Substanz	Hersteller	Bestellnummer	Konzentration Stammlösung
FGF-2	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)	#8910	10 ng/μl
IGF1	PeptoTech (Rocky Hill, USA)	#100-11	10 ng/μl
TGFβ	PeptoTech (Rocky Hill, USA)	#100-21	5 ng/μl

2.7 Farbreagenzien für Immunfluoreszenz

Aktinfärbung: Texas Red-X Phalloidin
Life Technologies (Carlsbad, USA) #T7471
0,2 U/μl Stammlösung, zur Anwendung 1:200 verdünnt

Kernfärbung 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) #D9564
0,1 μg/ml Stammlösung zur Anwendung 1:10000 verdünnt

2.8 Molekulargewichtsmarker

Page Ruler Prestained Protein Ladder 10-170 kDa
Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), #26617

Tabelle 7: Molekulargewichtsmarker

Molekulargewichtsangaben
170 kDa
130 kDa
95 kDa
72 kDa
55 kDa
46 kDa
34 kDa

2.9 Zelllinien

Tabelle 8: Zelllinien

Bezeichnung	Quelle/Bestellnummer	Zelltyp
A549	ATCC_CCL-185	Lungenkarzinom
BxPC3	ATCC_CRL1687	Pankreasadenokarzinom

Bezeichnung	Quelle/Bestellnummer	Zelltyp
Calu-3	ATCC_HTB-55	Lungenadenokarzinom
Colo699	DSMZ_ACC 196	Lungenadenokarzinom
H23	ATCC_CRL-5800	Lungenadenokarzinom
H358	ATCC_CRL-5807	Bronchoalveoläres Karzinom
HCC44	DSMZ_ACC 534	Lungenadenokarzinom

Die Angaben zum Zelltyp beziehen sich auf die offiziellen Angaben der ATCC (*American Type Culture Collection*, (Manassas, (VA) USA)) und der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, (Braunschweig, Deutschland)). In der Literatur wird A549 überwiegend als Adenokarzinom der Lunge bezeichnet (Hung et al. 2014, Weir et al. 2007). Das bronchoalveoläre Karzinom stellt einen Subtyp des Adenokarzinoms der Lunge dar (Travis et al. 2013).

2.10 Software

Tabelle 9: Software

Programm	Hersteller	Version
analySIS	Olympus (Shinjuku, Japan)	Version 3.2
CellSens Dimension	Olympus (Shinjuku, Japan)	©2010
Adobe Photoshop	Adobe Systems (San José, USA)	CreativeSuite2
Citavi Literaturverwaltung	Swiss Academic Software (Wädenswil, Schweiz)	Version 3.4.2
FUSION-CAPT	Vilber Lourmat (Marne-la-Vallée, Frankreich)	Version 15.12
Odyssey SA Analysis Software	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)	Version 1.17

3 Methoden

Alle Methoden wurden nach der Standardlaboranleitung der Arbeitsgruppe durchgeführt. Etwaige Änderungen sind gekennzeichnet.

3.1 Zellkultur

Es wurden Zellen in 10 cm Schalen (Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), #83.1802.003), 6 cm Schalen (Sarstedt, #83.1801.003), oder 75 cm² Flaschen (Sarstedt, #83.1813.302) gezüchtet. Das Wachstum der Zellen erfolgte im Inkubator (CO₂-Inkubator, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), HERAcell 150i) bei 37 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 10% CO₂. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums unter sterilen Bedingungen.

Bei einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen umgesetzt. Dies erfolgte für die Zelllinien A549, H23, H358, HCC44 und Colo699 durch Absaugen des Mediums, anschließendes Waschen mit CMF-PBS, Inkubation mit 3 ml Trypsin-EDTA/EGTA (PAA Laboratories (Pasching, Österreich), #L11-004) und leichtem Schütteln bis sich die Zellen unter mikroskopischer Kontrolle ablösten. Das verbleibende Trypsin wurde durch 3 ml Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellen in der Flüssigkeit in ein steriles 15 ml Gefäß transferiert. Durch Zentrifugieren mit 200xg für 3 Minuten wurden die Zellen von der Flüssigkeit getrennt. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 5-10 ml Medium aufgenommen, vereinzelt und in neue Zellkulturschalen verteilt.

Bei den Zelllinien Calu-3 und BxPC3 erfolgte nach Absaugen des Mediums eine Inkubation in CMF-PBS unter Zugabe von 50 µM EDTA für max. 10 Minuten im CO₂-Inkubator. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA/EGTA max. 10 Minuten bis zur Ablösung inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben. 2,5x10⁵ Zellen wurden zum Weiterziehen in eine 10 cm Schale oder eine 75 cm² Flasche transferiert und mit 10 ml Medium inkubiert. Für Versuche wurden 5x10⁵ Zellen in 10 cm Schalen oder 1x10⁵ Zellen in 3 cm Schalen ausgesät.

3.1 Zellysatherstellung

Gesamtlysate wurden von Zellen, die 80-100%ige Konfluenz erreicht haben, hergestellt. Zu diesem Zwecke wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml TBS (4 °C) für eine 6 cm Schale bzw. 10 ml für eine 10 cm Schale gewaschen. Nach dem vollständigen Absaugen des TBS wurden die Zellen mit 100-400 µl Lysispuffer (RIPA, NOP oder p120-Lysispuffer) versetzt und mit einem Zellschaber abgekratzt. Der verwendete Lysispuffer wurde vor Gebrauch mit Proteaseinhibitor in einfacher Konzentration versetzt, um einen Abbau der Proteine durch intrazelluläre Proteasen zu verhindern. Beim Nachweis von

phosphorylierten Proteinen wurde zusätzlich in einfacher Konzentration Phosphataseinhibitor zum Lysispuffer dazu gegeben.

Um eventuell einsetzende Degradationen der Proteine während der Lysatherstellung zu verhindern, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt.

Die abgekratzten Zellen wurden mit einer Spritze unter Verwendung einer 26 Gauge-Kanüle in ein gekühltes 1,5 ml Gefäß überführt. Das Lysat wurde durch fünfmaliges (Lysispuffer-p120) bzw. sechsmaliges (NOP/RIPA) Aufziehen in eine Spritze mit einer 18 Gauge-Kanüle homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate 10 Minuten bei 16.200xg in einer 4 °C gekühlten Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand wurde entnommen und portioniert in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für die Herstellung von Lysat, welches zur Darstellung von Proteinen im Western Blot dienen sollte, wurde RIPA-Puffer verwendet. NOP-Puffer und p120-Puffer wurden dagegen zum Nachweis von Proteininteraktionen im Rahmen der Immunpräzipitation verwendet. Vorhandene schwache Wechselwirkungen zwischen den Proteinen wurden durch diesen Puffer nicht aufgebrochen und konnten detektiert werden.

3.3 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung der Proteinmenge im Lysat erfolgte mittels der Bicinchoninsäure-Methode (BCA). Es wurden 5 µl der lysierten Zellen mit 45 µl H₂O versetzt. Anschließend wurden jeweils 20 µl dieser Verdünnung in je ein Well einer 96-Wellplatte übertragen und mit 180 µl eines Kupfer(II)sulfat-BCA-Gemisches versehen. Dieses Gemisch enthält einen Teil einer 4%igen (M/V) Kupfer(II)sulfat-Lösung und 50 Anteile der Lösung BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) #23223). Die im Gemisch enthaltenen zweiwertigen Kupferionen reagieren quantitativ mit den Proteinen. Die dabei entstandenen einwertigen Kupferionen reagieren im zweiten Schritt mit BCA zu einem violetten Komplex. Dieser Komplex konnte anschließend mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert werden. Um die dabei absorbierte photometrisch dargestellte Lichtmenge einer Proteinmenge zuzuordnen, wurde in der gleichen Messung eine Verdünnungsreihe eines Standardproteins mitgemessen. Die Konzentration der Proben wurde durch Vergleich mit Absorptionwerten der Standardreihe, die 0-125 µg Protein /ml enthielt, bestimmt. Die Eichgerade wurde im Doppelansatz pipettiert.

Anschließend wurde der gesamte Ansatz bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlung auf 4 °C abgestoppt und die Absorption photometrisch bestimmt. Die gewonnenen Daten wurden in Excel übertragen und die Konzentrationen durch Vergleich mit den Eichwerten errechnet.

3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Spezifische Proteine wurden im Zelllysate mittels Western Blot nachgewiesen. Die Proteine wurden bei diesem Verfahren durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) der Größe nach aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran und die Detektion der Proteine mittels spezifischer Antikörper.

Dazu wurden Acrylamidgele der entsprechenden Konzentration (Tabelle 5) hergestellt. Das Acrylamidgel wurde zwischen zwei Glasplatten im Abstand von einem Millimeter gegossen. Zum Auspolymerisieren wurde das Gel mit einer Schicht H₂O-gesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach ca. einer Stunde wurde das Isobutanol gegen Wasser ausgetauscht. Das so gewonnene Trenngel konnte im Kühlschrank über Nacht endgültig auspolymerisieren. Am nächsten Tag wurde ein Sammelgel gemäß Tabelle 5 hergestellt. Im Anschluss wurde das Gel in eine Gelelektrophoreselaufkammer eingespannt und mit Laufpuffer gespült. Die „Taschen“ des Sammelgels wurden von Acrylamidresten freigewaschen.

Für den Nachweis von Proteinen von 80-200 kDa wurde ein 7,5%-Gel verwendet, für 50-150 kDa ein 8,5% und für 40-130 kDa ein 10%-Acrylamidgel.

Pro Laufspur wurden 30-50 µg Proteinlysate/Ladepuffer-Gemisch eingesetzt und es wurde jeweils ein Marker zur Größenordnung der Proteine in eine freie Spur gegeben.

Die Proteinlysate mussten vor dem Transfer in das Gel vorbereitet werden. Zu diesem Zweck wurden sie mit Probenpuffer-SDS versetzt, so dass mindestens 20% des Endvolumens von maximal 30 µl, Probenpuffer entsprach. Das im Puffer vorhandene SDS lagerte sich an die Proteine an und glich die Ladungen an, so dass die Proteine alle eine negative Ladung aufwiesen. Das vorhandene DTT reduzierte Disulfidbrücken und linearisierte die Proteine. Glycerin verhinderte durch seine im Vergleich zu Wasser höhere Dichte, dass die Proben wieder aus der Tasche wanderten.

Um die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzuheben, wurden die Proben vor Beladung und nach Vermischung mit dem Probenpuffer bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt (für den Nachweis von Rezeptoren wurde lediglich für 10 Minuten auf 60 °C erhitzt).

Die Proteine wurden dabei mit 80 V für 15 Minuten an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel fokussiert und anschließend mit 120 V für 45-90 Minuten nach ihrer Größe aufgetrennt.

Die durch Gelelektrophorese gewonnene Gelmatrix wurde im Anschluss von den zwei Glasplatten getrennt und die darin enthaltenen Proteine mittels Nass-Blot auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Großbritannien), #10600002) übertragen.

Es wurde dabei folgender Aufbau für den Nass-Blot verwendet: Die Seite der Kathode wurde mit Filterschwämmen abgedeckt, es folgten zwei Lagen Filterpapier und anschließend das Acrylamidgel. In Richtung der Anode wurde die Nitrozellulosemembran aufgebracht und diese mit zwei Lagen Filterpapier und Filterschwämmen an das Gel gepresst. Die einzelnen Schichten wurden luftblasenfrei übereinander gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass sowohl die Membran als auch das Gel nicht austrockneten. Dieser Aufbau wurde in eine Blotkammer eingespannt und mit Transferpuffer überschichtet. Die negativ geladenen Proteine wurden durch den Strom auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Es wurde dabei eine Spannung von 20 V verwendet und 11 Stunden geblottet. Für kleinere Proteine (<100 kDa) wurde dieser Vorgang mit 70 V und 2,5 Stunden Dauer durchgeführt.

Um die Effizienz der Proteinübertragung darzustellen, wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Transfer mittels Ponceaurot-Färbung reversibel gefärbt. Die Membran wurde dabei ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur in Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde überschüssige Färbelösung mit H₂O herausgewaschen. Diese Färbung stellt reversibel Proteine dar und lässt sich nach Dokumentation der Übertragung mittels TBS wieder vollständig von der Membran entfernen.

Da es auch möglich war, dass Proteine in der Acrylamidgelmatrix zurück geblieben sind, wurden die Acrylamidgele nach dem Blotten mittels Coomassiefärbung gefärbt. Die Gelmatrix wurde zunächst 3 Stunden in Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal für jeweils mindestens 3 Stunden in Coomassie-Brilliant-Blau-Entfärbelösung eingelegt. Das Ergebnis wurde dokumentiert und die gefärbten Acrylamidgele verworfen.

Um zu verhindern, dass Antikörper, welche ebenfalls Proteine sind, unspezifisch in die unbeladenen „Lücken“ in der Nitrozellulosemembran binden, musste die Membran „geblockt“ werden. Zu diesem Zweck wurde eine Lösung aus TBS mit 5% (M/V) Magermilchpulver (Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)) hergestellt und die Membran darin eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit TBS, um überschüssiges Magermilchpulver auszuwaschen. Um phosphorylierte Proteinen nachzuweisen, wurde anstelle einer Magermilchlösung eine 3%ige (M/V) Rinderserumalbuminlösung (Serva Electrophoresis) in TBS verwendet.

3.5 Antikörperfärbung

Der Nachweis der einzelnen Proteine erfolgte mittels Darstellung durch Antikörper. Im ersten Schritt wurde die geblockte Nitrozellulosemembran mit einem Antikörper gegen das zu identifizierende Protein inkubiert. Die Antikörper wurden dabei nach Herstellerangabe bzw. Laborerfahrung (Tabelle 2) in einer 0,3%igen (M/V)

Rinderserumalbuminlösung in CMF-PBS unter Zugabe von 0,1% (V/V) Tween 20 (Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), #9127) verdünnt. Für den Nachweis von phosphorylierten Proteinen wurde eine 0,3%ige (M/V) Rinderserumalbuminlösung in TBS unter Zugabe von 0,1% (V/V) Tween 20 verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C im Kühlraum über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2 bis 3 Stunden auf einer Wippe. Anschließend wurde die Antikörperlösung verworfen und die Membran von ungebundenem Antikörper durch dreimaliges Waschen mit CMF-PBS für jeweils 10 Minuten gereinigt.

Der Nachweis des primären Antikörpers, und damit indirekt des nachzuweisenden Proteins, erfolgte mit verschiedenen sekundären Antikörpern (Tabelle 3). Es wurde dabei ein Antikörper verwendet, der gegen den Fc-Anteil des primären Antikörpers gerichtet war und mit einem Enzym (HRP) oder einem Infrarotfarbstoff (680/700 nm oder 770/795 nm) gekoppelt ist. HRP bezeichnet dabei die *horseradish peroxidase*, die Meerrettichperoxidase, welche in der Lage ist Luminol umzusetzen und dabei Lichtquanten zu erzeugen. Diese konnten mit dem Chemilumineszenz-Detektionssystem Fusion-SL von Vilber Lourmat (Marne-la-Vallée, Frankreich) detektiert werden.

Mit Infrarotfluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper wurden benutzt, wenn eine Detektion im Odyssey SA von LI-COR Biosciences (Lincoln, USA) geplant war. Dieses System ermöglichte den simultanen Nachweis von zwei verschiedenen Fluoreszenzmolekülen. Nachteilig ist hingegen, dass bei diesem System die Sensitivität geringer ausfällt.

Der zweite Antikörper wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, ebenfalls in einer 0,3%igen (M/V) Rinderserumalbuminlösung in CMF-PBS unter Zugabe von 0,1% (V/V) Tween 20. Anschließend wurde die Antikörperlösung verworfen und überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen mit CMF-PBS für jeweils 5 Minuten entfernt.

Die Detektion im Odyssey SA konnte im Anschluss direkt erfolgen, für die Detektion im FusionSL wurde die Membran 3 Minuten in ECL-Reagenz (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), #34080) eingelegt.

3.6 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation diente der Anreicherung eines Proteinkomplexes und dem Nachweis der im Komplex enthaltenen Proteine. Zu diesem Zweck wurde ein Antikörper gegen ein spezifisches Protein an ferromagnetische Beads (Protein A, Merck Millipore (Billerica, USA), #LSKMAGA02) gebunden. Diese Beads wurden mit Lysat inkubiert, anschließend mit einem Magneten aus dem Gemisch isoliert und aufgereinigt. Das isolierte Protein, sowie dessen Interaktionspartner, konnten im Western Blot nachgewiesen werden.

Im ersten Schritt erfolgte eine Koppelung des Antikörpers an die Beads. Es wurde 1 µg Anti-Cadherin-E Antikörper an 25 µl der magnetischen Beads gekoppelt. Diese Koppelung erfolgte bei Raumtemperatur durch kontinuierliche Drehung in 500 µl IP-Puffer für 45 Minuten.

Anschließend wurden die magnetischen Beads, die den Antikörper an ihrem Fc-Anteil gebunden haben, vom IP-Puffer mittels eines Magneten getrennt und der resultierende Überstand verworfen.

Gleichzeitig wurde in einem zweiten Reaktionsansatz 500-1000 µg Zelllysat mit 15 µl magnetischen Beads gereinigt (*Preclearing*). Dieser Schritt fand in einem Gesamtvolumen von 400 µl statt, wobei das fehlende Volumen durch IP-Puffer aufgefüllt wurde. Um eine Degradation zu verhindern, erfolgte das *Preclearing* bei 4 °C im Kühlraum und unter Zugabe von einfachkonzentriertem Proteaseinhibitor. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten ebenfalls unter kontinuierlicher Durchmischung. Die Beads mit unspezifischen Interaktionspartnern wurden anschließend mittels eines Magneten aus dem Lysat entfernt. Die Beads mit den unspezifischen Interaktionspartnern wurden verworfen und die Lösung wurde für den zweiten Schritt der Immunpräzipitation verwendet.

Im zweiten Schritt wurden nun die antikörperbeladenen Beads zu dem gereinigten Lysat gegeben und 3 Stunden unter kontinuierlicher Durchmischung bei 4 °C inkubiert. Um während dieser Zeit eine Degradation zu verhindern, erfolgte die Zugabe von 100 µl IP-Puffer mit fünffachkonzentrierten Proteaseinhibitor.

Im dritten Schritt wurden die magnetischen Beads vom Lysat getrennt und das Lysat verworfen. Es erfolgten zwei Waschschrte der beladenen Beads mit jeweils 500 µl IP-Puffer in denen die Beads resuspendiert wurden und anschließend magnetisch erneut aus der Lösung gezogen wurden. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschrte selben Musters mit jeweils 500 µl IP-Waschpuffer.

Abschließend wurden die Beads in 25µl vierfachkonzentrierten Probenpuffer-Laemmli resuspendiert. Diese Suspension wurde 10 Minuten bei 90 °C (60 °C, wenn ein Rezeptornachweis geplant war) erhitzt. Die anschließenden Schritte (SDS-Page, Western Blot und Antikörperfärbung) erfolgten wie bereits beschrieben.

3.7 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz diente dem Nachweis der Lokalisation von Proteinen in Zellen und kann Hinweise auf eine Koloalitionen geben. Es wurden zu diesem Zwecke subkonfluente Zellen passagiert und anschließend in 6-Well-Platten (Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), #83.1839.300) auf Deckgläsern ausgesät, sodass die Zellen mindestens 5 Tage Wachstumsphase erhielten, bevor sie fixiert und gefärbt wurden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen während der Wachstumsphase in 3 ml Zellkulturmedium

inkubiert, welches alle 2 bis 3 Tage gewechselt wurde. Die Inkubation erfolgte bei 10% CO₂ und 37 °C.

Nach dem Erreichen des gewünschten Konfluenzgrades der Zellen, wurde das Medium verworfen, die Zellen mit CMF-PBS gewaschen und anschließend fixiert. Die Fixierung erfolgte für 10-15 Minuten mittels -20 °C kaltem Methanol/Aceton (im Verhältnis 1:1) zum Nachweis von membrangebundenen Proteinen oder mittels 2%iger (M/V) Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für zytosolische Proteine. Bei Fixierung durch PFA wurden die fixierten Membranen mittels einer Inkubation in 0,2% (V/V) Triton X-100 in CMF-PBS für 5 Minuten permeabilisiert. Die Reste des Fixierungsgemisches wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit CMF-PBS für jeweils 5 Minuten entfernt.

Um unspezifische Anfärbungen des Antikörpers in den fixierten Zellen zu verhindern, erfolgte eine einstündige Blockung mit einer 3%igen (M/V) Rinderserumalbuminlösung in CMF-PBS. Überschüssiges Rinderserumalbumin wurde im Anschluss durch CMF-PBS ausgewaschen.

Zur Detektion der gesuchten Proteine erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpers (Tabelle 2). Um gleichzeitig 2 verschiedene Proteine zu detektieren und eventuelle Überlagerungen darzustellen, wurden 2 Antikörper verschiedener Spezies kombiniert. Die Applikation des Antikörpers erfolgte in einer Lösung aus 0,3% (M/V) Rinderserumalbumin in CMF-PBS für eine Stunde in einer feuchten Kammer. Im Anschluss wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges fünfminütiges Waschen mit CMF-PBS entfernt.

Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte mit den in Tabelle 4 angebenen Antikörpern ebenfalls in einer Lösung mit 0,3% (M/V) Rinderserumalbumin in CMF-PBS. Zu jeder Antikörperverdünnungslösung wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in der Verdünnung 1:10.000 hinzugegeben. DAPI lagert sich den DNA-Molekülen an und ermöglicht die Darstellung des Nukleus zur Lokalisation der Zellen in der Mikroskopie.

Durch dreimaliges Waschen mit CMF-PBS für jeweils 5 Minuten wurden erneut ungebundene Antikörper herausgewaschen. Die so gewonnen fixierten Zellen wurden mit H₂O von überschüssigen Salzen frei gewaschen, anschließend mit Evanol eingedeckelt und unter dem Immunfluoreszenzmikroskop analysiert.

Zum Nachweis von filamentösen Aktin wurde auf einen Antikörper verzichtet und Phalloidin, ein Alkaloid des grünen Knollenblätterpilzes, welches sich spezifisch an filamentöses Aktin anlagert, benutzt. Zur Detektion im Immunfluoreszenzmikroskop ist dieses Alkaloid mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

3.8 Tritonfraktionierung

Um die Lokalisation von Proteinen in der Zelle genauer darzustellen, besteht die Möglichkeit einer Tritonfraktionierung. Bei diesem Verfahren werden die Zellen mit einem Puffer, welcher Triton X-100 enthält, gewaschen. Triton X-100 löst die Zellmembran auf und ermöglicht es Proteine aus der Zellmembran und dem Zytosol, welche nicht mit dem Zytoskelett verbunden sind, in das Lysat zu extrahieren (tritonlösliche Fraktion). Durch Zentrifugation kann anschließend die tritonlösliche Fraktion von der tritonunlöslichen Fraktion, welche Proteine mit Assoziation zum Zytoskelett bzw. zu den Zellorganellen enthält, getrennt werden.

Die für diesen Versuch verwendeten Zellen wurden bis zum konfluenten Zustand inkubiert. Das Medium wurde entfernt und es erfolgte ein Waschschrift mit 4 °C kaltem TBS und anschließender fünfminütiger Inkubation mit 400 µl Tritonfraktionierungspuffer unter Zugabe von einfach konzentriertem Proteaseinhibitor. Die Inkubation erfolgte auf einem Rotationsschüttler (60 Umdrehungen/Minute) in einer Eiswanne um Degradation zu verhindern. Die Zellen wurden abgeschabt, mit einer gelben Kanüle dreimal aufgezogen und in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 13.400xg für 10 Minuten.

Der Überstand enthielt die tritonlösliche Fraktion und wurde in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C bis -80 °C gelagert.

Das entstandene Sediment wurde mit 200 µl Lysis-HEPES-Puffer gewaschen und anschließend erneut für 5 Minuten bei 13.400xg zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen und das Sediment in 400 µl RIPA-Puffer aufgenommen und sechsmalig mittels einer 26G Kanüle homogenisiert. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 Minuten bei 13.400xg konnte der Überstand (tritonunlösliche Fraktion) portioniert in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C bis -80 °C eingefroren werden.

3.9 Aggregationsassay

Zur Bestimmung der Aggregationsfähigkeit von Zellen wurden konfluente Zellen von ihren Zellkulturplatten gelöst. Dies erfolgte, mit Ausnahme von BxPc3 und Calu-3, mittels zweimaligen Waschen mit CMF-PBS für jeweils 10 Minuten und anschließender Inkubation mit Accutase (Merck Millipore (Billerica, USA), #SCR005) für 1-2 Minuten. Die dabei gewonnenen Zellen wurden in ein 15 ml Gefäß überführt und die enzymatische Aktivität der Accutase durch Zugabe von DMEM gestoppt. Die Zellen wurden 3 Minuten bei 200xg abzentrifugiert und anschließend in 5-10 ml DMEM vereinzelt. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und es wurden jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen in eine 6-Well-Platte für „nichtadhärente“ Zellen (Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), #83.1839.500) übertragen. Das Gesamtvolumen wurde mit DMEM auf 2 ml aufgefüllt.

Eine Stimulation erfolgte mit 10 ng/ml TGF β oder 10 ng/ml FGF-2. Der Entzug von Calciumionen erfolgte durch Inkubation in DMEM mit 25 μ M EDTA. Die Aggregation erfolgte unter Rotation von etwa 80 Umdrehungen/Minute und 37 °C im Rotationsschüttler. Um Änderungen des pH-Wertes während der Reaktion abzufangen, erfolgte die Zugabe von HEPES in Konzentration von 25 mM.

Nach 5 Minuten wurden die Platten aus dem Rotationsschüttler entfernt und 2 Minuten unbewegt gelassen, um ein Absetzen der Zellen zu ermöglichen. Die Partikelzahl wurde dokumentiert, indem drei Gesichtsfelder mit einem zehnfachen Objektiv fotografiert wurden. Anschließend wurden die Zellen wieder in Rotation versetzt und weitere Werte nach 15, 30 und 60 Minuten ermittelt. Die Partikel wurden in einem jeweils 300*300 μ m² großen Ausschnitt bestimmt. Ein Partikel entsprach dabei einer Einzelzelle oder einem Aggregat aus mehreren Zellen.

Der Aggregationsindex wurde nach folgender Formel gebildet:

Index = $(P_0 \cdot P_{x_{min}}) / P_0$ wobei P_0 der Partikelanzahl zum Zeitpunkt 0 Minuten entspricht und $P_{x_{min}}$ der Partikelanzahl nach 15, 30 oder 60 Minuten entspricht.

3.10 Wundheilungsassay

Zur Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit von Zellen wurden diese in 6-Well-Platten (Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), #83.1839.300) ausgesät und bis zum konfluenten Zustand inkubiert. Diesen Zellen wurde das Zellkulturmedium entzogen und durch DMEM + 1% (V/V) FCS ersetzt. Um eine weitere Teilung der Zellen zu unterbinden, wurde Mitomycin C (Sigma-Aldrich (St. Louis USA), # M4287-2MG) in der Konzentration von 10 μ g/ml Medium für 2 Stunden hinzugegeben. Das Mitomycin C-haltige Medium wurde im Anschluss durch DMEM mit 1% (V/V) FCS ersetzt. Je nach gewähltem Versuchsaufbau erfolgte eine Stimulation der Zellen durch Zugabe von 2,5 ng/ml oder 7,5 ng/ml TGF β .

Mittels einer 20 μ l Pipettenspitze wurde ein ca. 350 μ m großer Spalt in den Zellrasen geritzt und die Breite des Spaltes mikroskopisch dokumentiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 10% CO₂ im Inkubator. Die Spaltbreite wurde nach einer, 24 und 48 Stunden kontrolliert und dokumentiert. Pro Versuchsansatz bzw. Well wurden an 6 Stellen die Spaltbreite vermessen. In der anschließenden Auswertung wurde die Migrationsgeschwindigkeit unter TGF β -Einfluss mit den Werten ohne Stimulation verglichen.

3.11 Statistische Angaben

Die Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, dreimal wiederholt und repräsentative Ergebnisse dargestellt. Die Wundheilungs- und Aggregationsassays wurden dreimal wiederholt und es wurden Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Phasenkontrastaufnahmen der verwendeten NSCLC-Zelllinien

In Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene NSCLC-Zelllinien untersucht. Aufgrund der großen Heterogenität von Lungentumoren der NSCLC-Gruppe wurde die Analyse auf Adenokarzinomzelllinien beschränkt.

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um A549, Calu-3, Colo699, H23, H358 und HCC44. Abbildung 3 zeigt Phasenkontrastaufnahmen der verschiedenen Zellen.

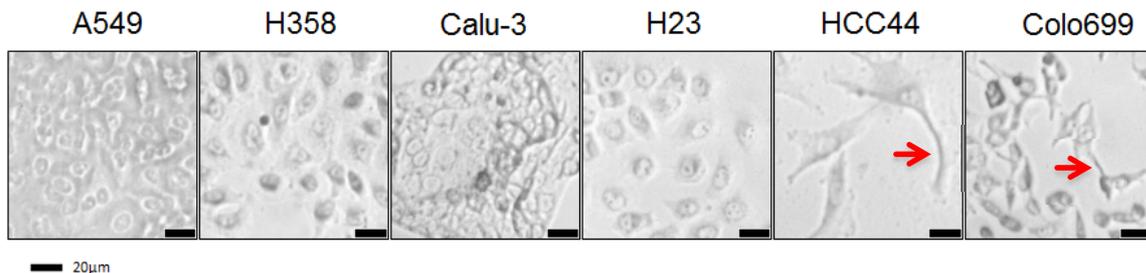


Abbildung 3: Phasenkontrastaufnahmen der verwendeten Zelllinien.

Die verwendeten Zelllinien zeigen in mikroskopischer Betrachtung erhebliche Unterschiede z.B. in der Zellgröße. HCC44 stellen die größten Zellen dar, wohingegen die Zellen der Zelllinien Calu-3, H23 und Colo699 wesentlich kleiner sind. HCC44 und Colo699 weisen elongierte Zellkörper und lange Zellausläufer auf (→), was einer fibroblastenähnlichen Morphologie entspricht.

Die Zelllinien zeigen erkennbare Unterschiede in ihrer mikroskopischen Morphologie. HCC44-Zellen sind deutlich größer als Zellen der übrigen Zelllinien. Zellen der Zelllinie Calu-3 und A549 zeigen kaum Zellausläufer, wohingegen HCC44 und Colo699 lange Zellausläufer und einen elongierten Zellkörper besitzen (→ in Abbildung 3). Diese Eigenschaften von HCC44 und Colo699 werden als fibroblastenähnlich bezeichnet und können als Hinweis auf eine bereits teilweise durchlaufene EMT verstanden werden.

4.2 Analyse der Cadherine in ausgewählten NSCLC-Zelllinien

Die dargestellten Phasenkontrastaufnahmen der Zelllinien haben bereits die Heterogenität der Adenokarzinomzelllinien aufzeigen können. Im nächsten Schritt wurden nun die untersuchten Adenokarzinome der Lunge auf das Vorhandensein eines E-Cadherin-Catenin-Komplex analysiert. Zu diesem Zweck wurde mittels Western Blot der Proteingehalt von E-Cadherin in den Zellen ermittelt. In der Literatur wird zudem erwähnt, dass es beim Verlust von E-Cadherin zur Expression anderer Cadherine kommen kann. Um diesen *Cadherin-Switch* zu untersuchen, wurden weitere klassische Cadherine, wie N- und P-Cadherin und das atypische Cadherin-11 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

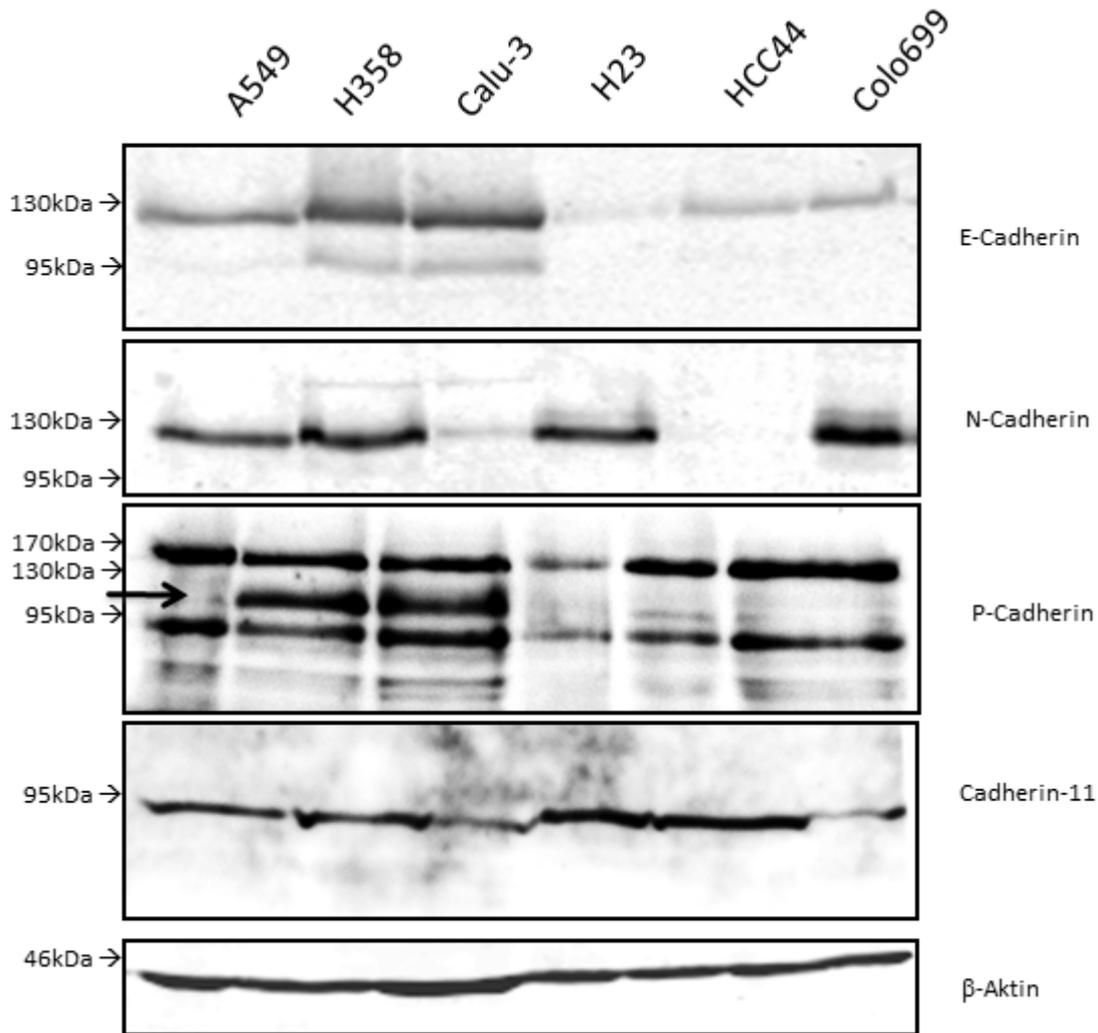


Abbildung 4: Analyse der Cadherin-Proteinexpression verschiedener Adenokarzinomzelllinien der Lunge mittels Western Blot.

E-Cadherin stellt sich im Western Blot mit einer Bande bei ca. 125 kDa dar. Eine weitere möglicherweise degradationsbedingte Bande befindet sich bei 95 kDa. E-Cadherin findet sich in großer Menge in H358 und Calu-3, in mittlere Menge in A549, HCC44 und Colo699 und in geringer Menge in H23. N-Cadherin (ca. 125 kDa) lässt sich in A549, H358, H23 und Colo699 in großer, in Calu-3 dagegen in geringer Menge, nachweisen. In HCC44 Zellen ist kein N-Cadherin nachweisbar. Eine spezifische Bande für P-Cadherin (→) bei ca. 120 kDa lässt sich in H358 und Calu-3 Zellen und in geringen Maße in HCC44 detektieren. Cadherin-11, welches laut Literaturangaben im Western Blot mit einem Molekulargewicht von 120 kDa zur Darstellung kommen soll, lässt sich in keiner der untersuchten Zellen nachweisen. Der β -Aktin-Nachweis dient als Beladungskontrolle. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Versuchen.

E-Cadherin stellt sich im Western Blot mit einer Bande bei ca. 125 kDa dar. Eine zweite Bande bei ca. 95 kDa zeigt sich insbesondere in Zellen mit einer großen Menge von E-Cadherin und stellt vermutlich eine Degradationsform dieses Moleküls dar. Es zeigen sich erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten Zellen. In H358 und Calu-3 Zellen lassen sich große Mengen E-Cadherin detektieren, gefolgt von A549 Zellen. HCC44 und Colo699 Zellen zeigen im Vergleich dazu eine mittlere Menge an

E-Cadherin. In H23 findet sich von allen untersuchten Zellen die geringste Menge von E-Cadherin.

N-Cadherin imponiert im Western Blot mit einer Bande in Höhe von ca. 125 kDa. Große Mengen von N-Cadherin sind in Colo699, H23, H358 und A549 zu detektieren. Calu-3 Zellen dagegen besitzen sehr wenig N-Cadherin und HCC44 ist frei von N-Cadherin.

Beim Nachweis von P-Cadherin kam es zur Detektion verschiedener unspezifischer Banden in Höhe von 170 kDa und 95 kDa. Letztere ist möglicherweise eine Degradationsbande. Die spezifische Bande von P-Cadherin in Höhe von 120 kDa (→ in Abbildung 4) ist bei H358 und Calu-3 im hohen Maße nachweisbar, in HCC44 in sehr geringem Maße, in den anderen drei untersuchten Zelllinien ist kein P-Cadherin nachweisbar.

Cadherin-11, als ein Beispiel für ein atypisches Cadherin, soll laut Literatur bei 120 kDa zu detektieren sein. Die Vorstufe dieses Proteins soll im Western Blot bei 130 kDa zum Nachweis kommen. In den untersuchten Zellen lässt sich weder die 130 kDa schwere Vorstufe noch das 120 kDa schwere endgültige Protein nachweisen. Lediglich bei 90 kDa zeigt sich in allen untersuchten Zelllinien eine Bande. Diese Bande könnte unspezifisch sein oder auf eine Vorstufe hinweisen, welche noch nicht vollständig im Golgi-Apparat modifiziert wurde und daher nicht die zu erwartende Größe von 120 kDa aufweist.

4.3 Analyse der Catenine in den untersuchten Zelllinien

Sowohl E-Cadherin, als auch dessen Bindungspartner, die Catenine, müssen vorhanden sein, damit eine Zelle einen E-Cadherin-Catenin-Komplex bilden kann. Dieser Komplex ist Teil einer stabilen epithelialen Zell-Zell-Adhäsion. Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen Catenine nachgewiesen. Über die Bindung von β - oder γ -Catenin an die Catenin-Bindungs-Domäne des E-Cadherin-Moleküls wird eine Verbindung von E-Cadherin zu α -Catenin ermöglicht. α -Catenin wiederum verbindet den Komplex mit dem Aktinzytoskelett. Des Weiteren bindet p120ctn E-Cadherin und ermöglicht so das *lateral clustering* der Cadherine. Diese Bindung geschieht an der Juxta-Membran-Domäne von E-Cadherin und ist unabhängig von der Bindung der anderen Catenine. Abbildung 5 zeigt den Gehalt der genannten Catenine in den untersuchten Lungentumorzelllinien.

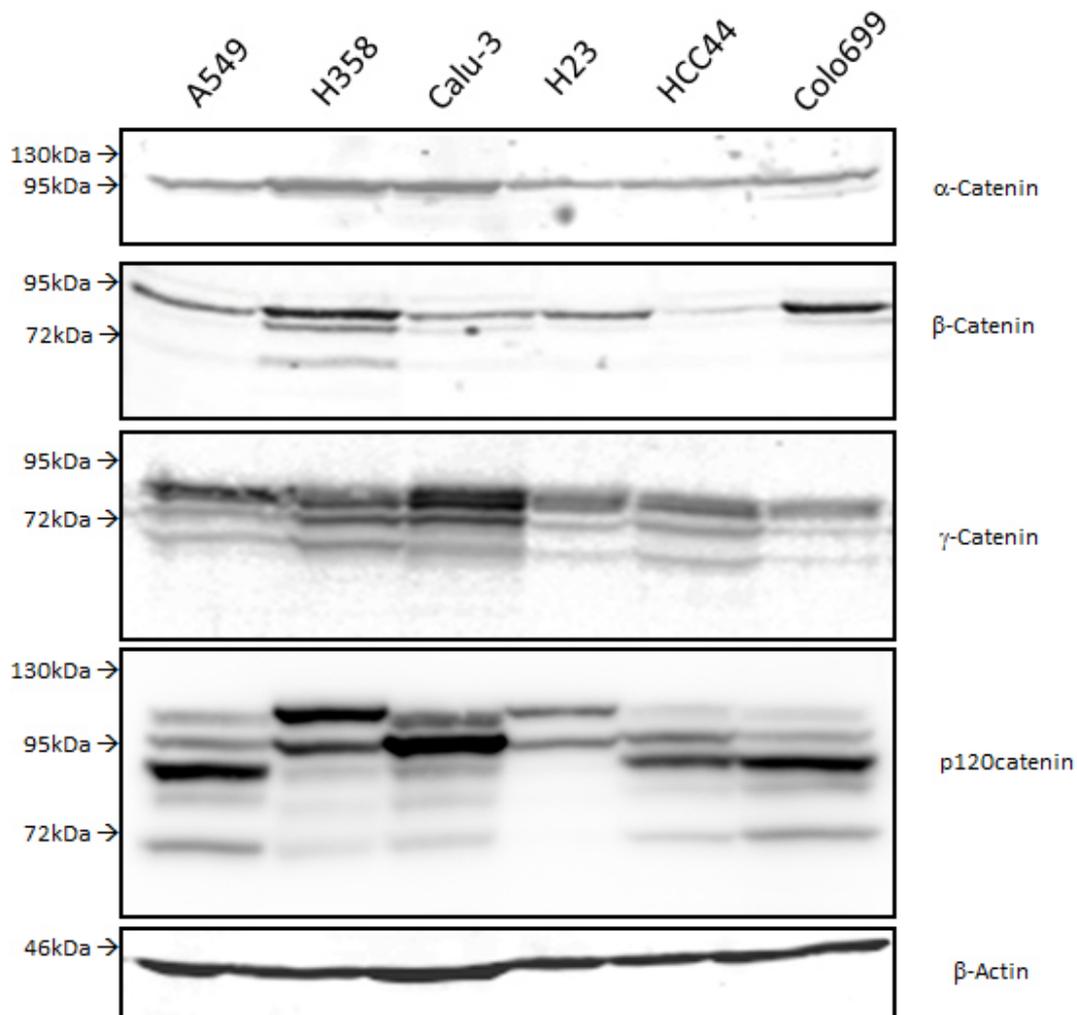


Abbildung 5: Analyse der Catenin-Proteinexpression verschiedener Adenokarzinomzelllinien der Lunge mittels Western Blot.

α -Catenin (102 kDa) ist in allen untersuchten Zelllinien nachweisbar, in H358 und Calu-3 in besonders großer Menge. β -Catenin (94 kDa) ist mit mehreren Banden im Bereich um 95 kDa nachweisbar. Dabei kann es sich um Modifikationen dieses Proteins, z.B. durch Phosphorylierung, handeln. Eine weitere Bande befindet sich bei 72 kDa und stellt vermutlich eine Degradationsbande dar. In H358, Colo699 lässt sich viel, in HCC44 dagegen wenig β -Catenin nachweisen. γ -Catenin (84 kDa) lässt sich analog zu β -Catenin mit zahlreichen Banden nachweisen. Insbesondere in A549, H358 und Calu-3 Zellen sind große Mengen dieses Proteins nachweisbar. P120ctn zeigt sich mit zahlreichen Isoformen im Bereich zwischen 120 und 80 kDa. Eine Bande kommt bei unter 72 kDa zur Darstellung und stellt möglicherweise ein Degradationsprodukt dar. Unterschiedliche Isoformen sind in unterschiedlichen Zellen nachweisbar. H23 zeigt nur geringe Mengen von p120ctn. Der β -Aktin-Nachweis dient als Beladungskontrolle. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Versuchen.

In allen untersuchten Zelllinien lassen sich die genannten Catenine nachweisen. α -Catenin, welches mit einem Molekulargewicht von 102 kDa nachgewiesen werden kann, ist in Calu-3 und H358 in großer Menge nachweisbar. Diese Zelllinien bilden ebenfalls große Mengen von E-Cadherin. In den übrigen Zelllinien ist weniger α -Catenin nachweisbar. Untereinander verglichen zeigen A549, H23, HCC44 und Colo699 eine ähnliche Expression dieses Proteins.

β -Catenin kommt im Western Blot mit einem Molekulargewicht von 90-94 kDa zur Darstellung. Mit den verwendeten Antikörpern lassen sich mehrere Banden nachweisen.

Dies kann als Hinweis für eventuelle Modifikationen durch beispielsweise Phosphorylierung verstanden werden. Bei den nachgewiesenen Banden in Höhe von 72 kDa handelt es sich dagegen vermutlich um Degradationsprodukte. γ -Catenin präsentiert sich im Western Blot ebenfalls mit mehreren Banden, wobei die stärksten Banden mit dem in der Literatur angegebenen Molekulargewicht von 84 kDa übereinstimmen. Bei den weiteren Banden kann es sich ebenfalls um modifizierte oder degradierte Produkte handeln.

H358 und Colo699 exprimieren eine große Menge β -Catenin. HCC44 dagegen besitzt nur wenig β -Catenin. Die anderen Zelllinien zeigen weniger β -Catenin als H358 und Colo699 aber mehr als HCC44. γ -Catenin kann β -Catenin im Cadherin-Catenin-Komplex ersetzen. HCC44, welches wenig β -Catenin bildet, exprimiert viel γ -Catenin. Die Zelllinie H358 dagegen, welche viel β -Catenin bildet, exprimiert auch viel γ -Catenin bei gleichzeitig hoher Menge von E-Cadherin. Calu-3 zeigt von den untersuchten Zelllinien die größte Menge von γ -Catenin. Neben den beschriebenen Vorkommen von γ -Catenin in dem E-Cadherin-Catenin-Komplex, ist γ -Catenin aber auch in Desmosomen, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert wurden, nachweisbar.

P120ctn existiert in verschiedenen Isoformen mit einem Molekulargewicht von 80-120 kDa. In den untersuchten Zelllinien lassen sich mehrere Banden im entsprechenden Größenbereich nachweisen, die mit dem Molekulargewicht der Isoformen 1, 2, 3 und 4 und Modifikationen dieser korrelieren. Eine weitere Bande zeigt sich bei unter 72 kDa, möglicherweise ein Degradationsprodukt. Auffällig ist, dass H23 sehr wenig p120ctn enthält und nur die größeren Isoformen bildet. H358 und Calu-3 dagegen bilden sehr viel p120ctn, insbesondere solches mit einem Molekulargewicht um 95 kDa, welches der Isoform 3 von p120ctn entsprechen könnte. A549, Colo699 und HCC44 exprimieren dagegen hauptsächlich eine Isoform bei ca. 90 kDa. Eine genauere Zuordnung der einzelnen Banden zu den Isoformen lässt sich allerdings aus diesem Versuch nicht ziehen und würde einen Vergleich mit exogen eingebrachten markierten Isoformen notwendig machen.

4.4 Phosphorylierung von p120ctn in Adenokarzinomzelllinien der Lunge

In der Literatur sind zahlreiche Phosphorylierungen von p120ctn beschrieben, die die Funktionen dieses Proteins beeinflussen und damit auch die Funktion des E-Cadherin-Catenin-Komplexes. Vier Zelllinien, zwei mit einer großen Menge (Calu-3 und H358) und zwei mit einer geringen Menge von E-Cadherin (H23 und HCC44), wurden auf die Phosphorylierung von p120ctn an vier verschiedenen Tyrosinresten (Y96, Y228, Y280, Y291) untersucht. Abbildung 6 zeigt die dabei erzielten Ergebnisse.

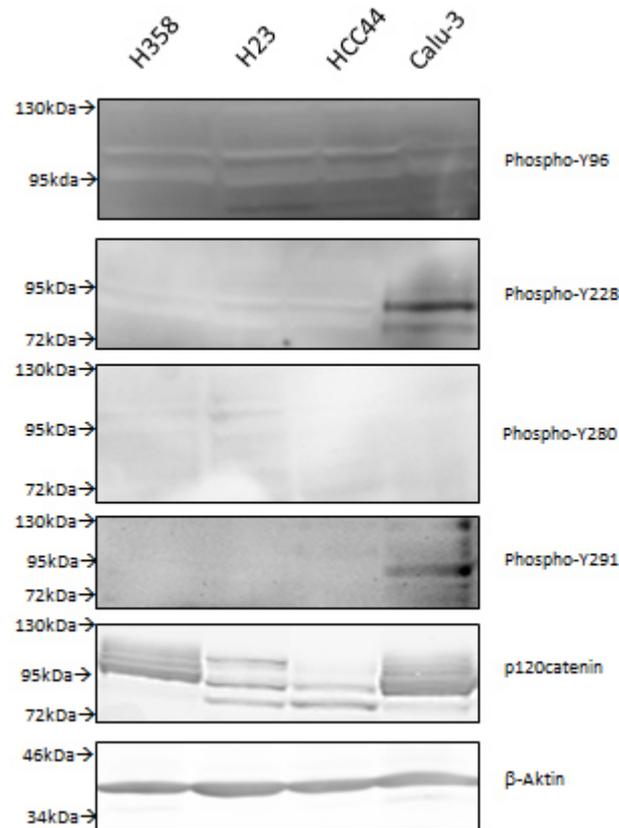


Abbildung 6: Analyse der Phosphorylierung von p120ctn an ausgewählten Tyrosinresten.

Es wurden Gesamtlysate der Zelllinien H358, H23, HCC44 und Calu-3 auf das Vorhandensein einer Phosphorylierung von p120ctn an den Tyrosinresten 96, 228, 280 und 291 untersucht. Es konnte kein Nachweis einer Phosphorylierung an Tyrosin 96 und 280 in den untersuchten Zelllinien erfolgen. Lediglich in Calu-3 lässt sich eine Phosphorylierung von Tyrosin 228 und 291 nachweisen. Der Nachweis der Phosphorylierungen in Calu-3 lässt sich in einem zweiten Versuch bestätigen. Der Nachweis von p120ctn beschreibt die Gesamtmenge des vorhandenen p120ctns in den Zellen. Der β -Aktin-Nachweis dient als Beladungskontrolle.

In den vier untersuchten NSCLC-Zelllinien lässt sich keine Phosphorylierung der Tyrosinreste 96 und 280 von p120ctn nachweisen. In Calu-3 Zellen kann die Phosphorylierung von Tyrosin 228 und 291 dargestellt werden.

4.5 Analyse der Lokalisation von E-Cadherin und Catenin in der Zelle

Im nächsten Schritt wurden die bereits bei der Phosphorylierung von p120ctn ausgewählten Zelllinien weitergehend analysiert. Mittels spezifischer Antikörper, welche gegen E-Cadherin, α -Catenin oder p120ctn, gerichtet sind, wurde die Lokalisation dieser Proteine in den Zellen dargestellt. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse für E-Cadherin und α -Catenin, Abbildung 8 für E-Cadherin und p120ctn.

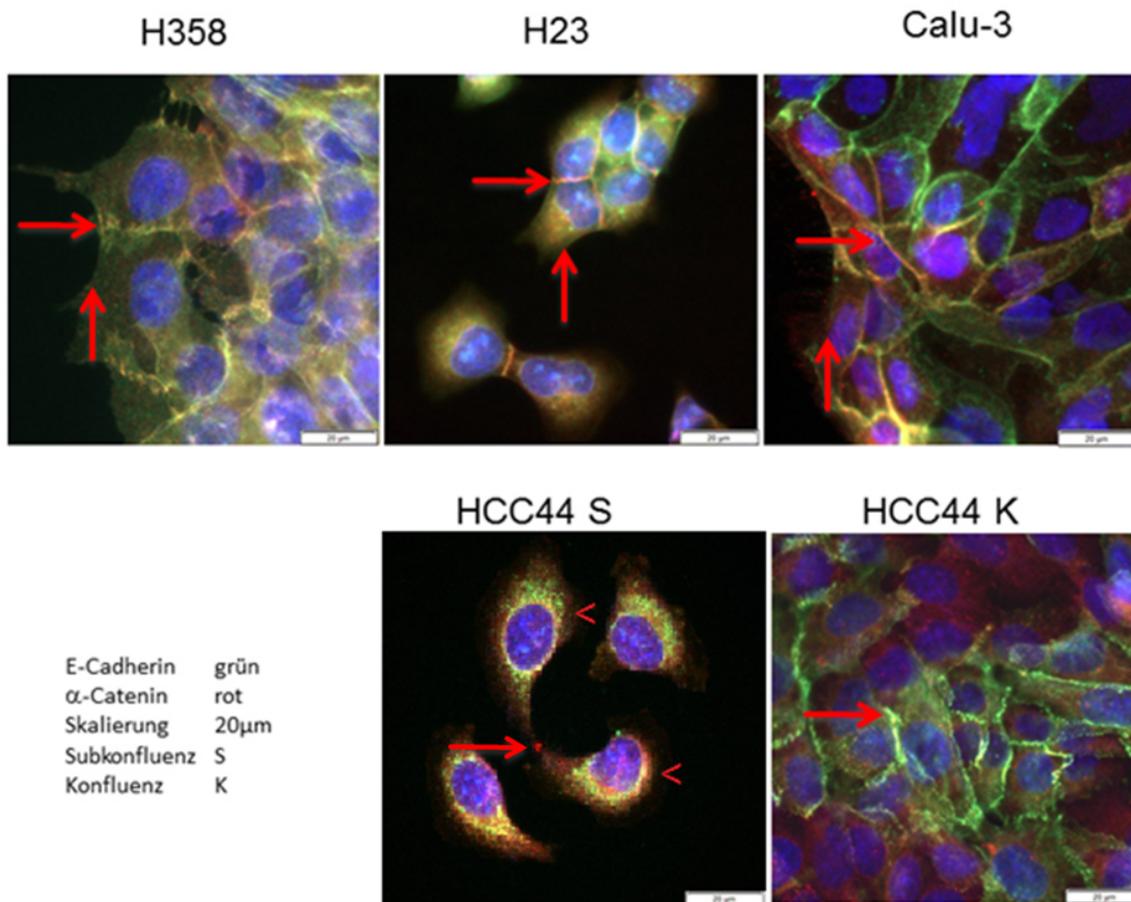


Abbildung 7: Analyse der Lokalisation von E-Cadherin und α -Catenin in ausgewählten Adenokarzinomzelllinien der Lunge.

Mittels Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von E-Cadherin (grün) und α -Catenin (rot) in NSCLC-Zellen dargestellt. Zellen der Zelllinie H358, H23 und Calu-3 zeigen im Bereich der Zell-Zell-Kontakte eine gleichzeitige Färbung von E-Cadherin (grün) und α -Catenin (rot) (\rightarrow). In Bereichen der Zelle, die keinen Kontakt zur Nachbarzelle haben (\uparrow) zeigt sich diese Färbung nicht. HCC44-Zellen zeigen im subkonfluenten Zustand kaum Zell-Zell-Kontaktbereiche (\rightarrow) in denen sich eine Kolokalisation nachweisen lässt. E-Cadherin und α -Catenin sind lediglich als perinukleäre vesikuläre Strukturen ($<$) nachweisbar. Erst im konfluenten Zustand kommt es zu einer schwachen Darstellung einer Kolokalisation beider Proteine (\rightarrow). Ein Teil der Zellen zeigt in diesem Zustand mehr E-Cadherin, andere Zellen dagegen mehr α -Catenin. Zur Lokalisation der Zellkerne wurde gleichzeitig mit DAPI gefärbt, welches sich blau darstellt.

In Abbildung 7 ist die Lokalisation von E-Cadherin in grün und die von α -Catenin in rot dargestellt. Die Immunfluoreszenz zeigt, dass alle Zellen die genannten Proteine bilden. In der Literatur ist beschrieben, dass die Verbindung von α -Catenin und E-Cadherin durch β - oder γ -Catenin ermöglicht wird. Eine Kolokalisation von α -Catenin und E-Cadherin, dargestellt in einer Überlagerung der Aufnahmekanäle der genannten Proteine, legt daher die Anwesenheit von β - oder γ -Catenin im Komplex nahe.

H358-Zellen zeigen im Bereich von Zell-Zell-Kontakten eine erhöhte membranständige Konzentration, sowohl von E-Cadherin als auch α -Catenin (\rightarrow in Abbildung 7). In Bereichen ohne Kontakt zu einer Nachbarzelle (\uparrow in Abbildung 7) zeigt sich diese

Anreicherung nicht, was für eine spezifische Darstellung von Zell-Zell-Kontakten durch den Nachweis der genannten Proteine spricht.

H23 und Calu-3 zeigen ebenso die genannte Kolokalisation (→ in Abbildung 7) und die fehlende Anfärbung in Bereichen ohne Verbindung zu einer Nachbarzelle (↑ in Abbildung 7). In HCC44-Zellen bilden sich Zell-Zell-Kontakte erst im konfluenten Zustand, also bei vollständiger Ausbreitung im Wachstumsgefäß. Im subkonfluenten Zustand lassen sich E-Cadherin und α -Catenin als perinukleäre vesikuläre Strukturen nachweisen (< in Abbildung 7). Zell-Zell-Kontakte, markiert durch die Überlagerung von α -Catenin und E-Cadherin, lassen sich nur im geringen Maße darstellen (→ in Abbildung 7). Auch im konfluenten Zustand ist nur eine schwache Kolokalisation von E-Cadherin und α -Catenin nachweisbar (→ in Abbildung 7). Ein Teil der Zellen zeigt eine erhöhte Menge E-Cadherin (grün), ein Teil dagegen eine erhöhte Menge von α -Catenin (rot).

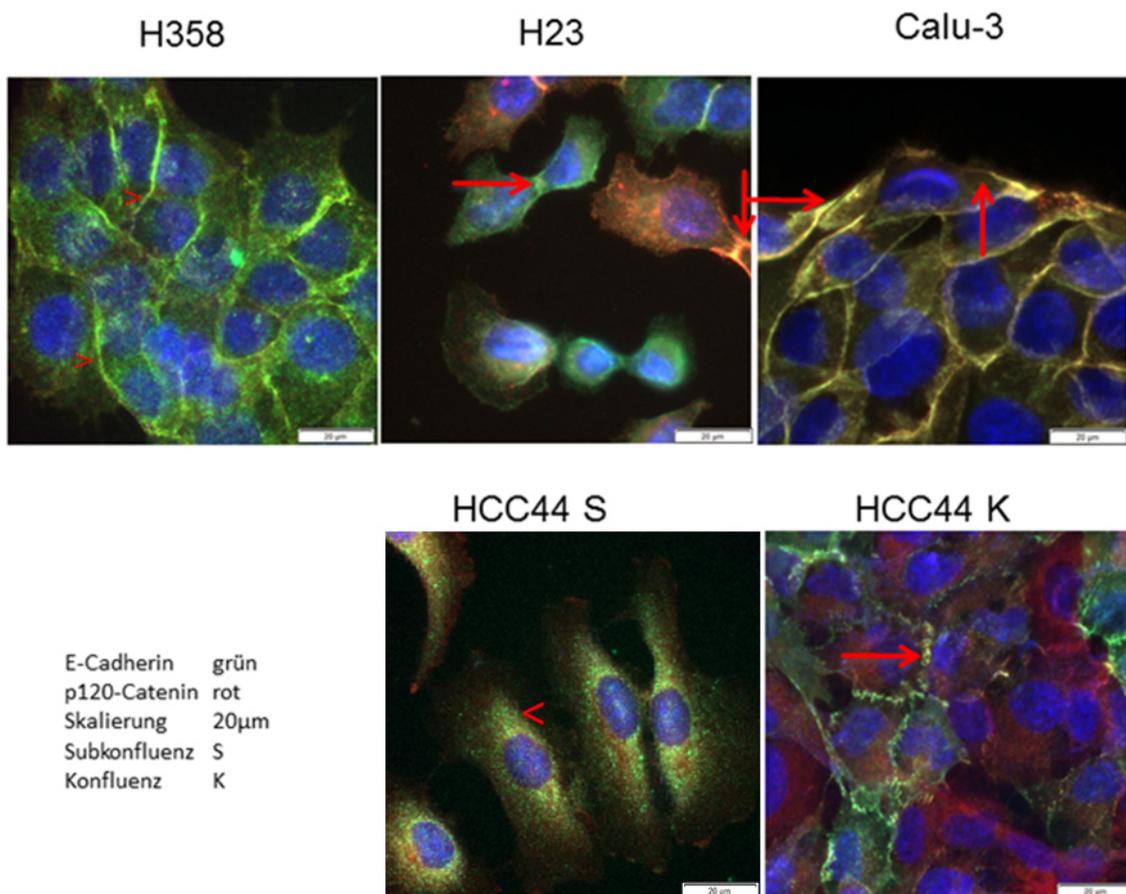


Abbildung 8: Analyse der Lokalisation von E-Cadherin und p120ctn in ausgewählten Adenokarzinomzelllinien der Lunge

Mittels Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von E-Cadherin (grün) und p120ctn (rot) in NSCLC-Zellen dargestellt. In H358 lässt sich lediglich E-Cadherin eindeutig nachweisen mit einer Konzentrationssteigerung in Bereichen der Zell-Zellkontakte (>). P120ctn ist dagegen, im Widerspruch zu den Ergebnissen aus der Western Blot Analyse (Abbildung 5) kaum nachweisbar. In H23 zeigen sich einerseits Zell-Zell-Kontaktbereiche mit einer erhöhten Anfärbung von E-Cadherin (→) ohne gleichzeitige Anfärbung von p120ctn, andererseits auch Zell-Zell-Kontaktbereiche mit einer gleichzeitigen Kolokalisation der beiden Proteine (↓).

Calu-3 zeigt eine Kolo-kalisation von E-Cadherin und p120ctn (→) dargestellt durch eine Anreicherung im Bereich von Zell-Zell-Kontakten ohne gleichzeitige Anreicherung im Bereich von Zellen ohne Kontakt zur Nachbarzelle (↑). In HCC44 lassen sich im subkonfluenten Zustand lediglich E-Cadherin und p120ctn als vesikuläre Strukturen nachweisen (<). Im konfluenten Zustand kommt es dagegen zur Anreicherung von E-Cadherin und geringen Mengen von p120ctn in der Membran (→). Einzelne Zellen bilden dabei mehr E-Cadherin, andere mehr p120ctn. Zur Lokalisation der Zellkerne wurde gleichzeitig mit DAPI gefärbt, welches sich blau darstellt.

Abbildung 8 stellt die Lokalisation von E-Cadherin in grün und von p120ctn in rot dar. Analog zu Abbildung 7 zeigt sich für Calu-3 eine Kolo-kalisation von E-Cadherin und p120ctn (→ in Abbildung 8). In Bereichen ohne Verbindung zu Nachbarzellen (↑ in Abbildung 8) ist keine erhöhte membranständige Konzentration der genannten Proteine nachweisbar. In H23 zeigen sich Zell-Zell-Kontakte mit einer Konzentrationssteigerung von E-Cadherin in der Membran (→ in Abbildung 8), ohne gleichzeitige Färbung von p120ctn und Zell-Zell-Kontakte mit einer verstärkten Färbung von p120ctn mit teilweiser Kolo-kalisation von E-Cadherin (↓ in Abbildung 8). E-Cadherin und p120ctn scheinen in diesen Zellen in unterschiedlichen Bereichen der Membran eingebaut zu werden. Nicht auszuschließen bleibt jedoch, dass es sich nur um Färbeartefakte handelt.

In der Zelllinie H358 lässt sich in den untersuchten Zellen nur E-Cadherin eindeutig anfärben. P120ctn war, im Widerspruch zu den Ergebnissen aus der Western Blot Untersuchung (Abbildung 5), nur schwach darstellbar. Eine Kolo-kalisation ließ sich in den Bereichen der Zell-Zell-Kontakte nicht darstellen (> in Abbildung 8).

Im subkonfluenten Zustand von HCC44-Zellen sind E-Cadherin und p120ctn analog zu Abbildung 7 als vesikuläre Strukturen nachweisbar (< in Abbildung 8). Im konfluenten Zustand bilden sich Membrananreicherungen, insbesondere von E-Cadherin in Bereichen von Zell-Zell-Kontakten aus (→ in Abbildung 8). Auffällig ist hier wiederum, dass sich in einzelnen Zellen E-Cadherin (grün), in andere wiederum p120ctn (rot) verstärkt nachweisen lässt.

HCC44 zeigt im Western Blot (Abbildung 4) eine größere Menge von E-Cadherin als H23. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz lassen vermuten, dass E-Cadherin in HCC44-Zellen erst im konfluenten Zustand gebildet und in Zell-Zell-Kontakte eingebaut wird, wohingegen in H23-Zellen bereits im subkonfluenten Zustand E-Cadherin in Zell-Zell-Kontakten nachweisbar ist.

4.6 Analyse des Aktinzytoskeletts von Adenokarzinomzelllinien der Lunge

Die bereits durchgeführten Versuche zeigen ein sehr heterogenes Bild der untersuchten Adenokarzinomzelllinien der Lunge in Bezug auf den E-Cadherin-Catenin-Komplex.

Im Rahmen einer EMT kommt es nicht nur zu Veränderungen dieses Komplexes bzw. zum Verlust der epithelialen Zell-Zell-Adhäsion, sondern auch zu charakteristischen Veränderungen des Aktinzytoskeletts. Um diese Veränderungen darzustellen, wurden

F-Aktinfärbungen mit Hilfe von Phalloidin von H358, H23, HCC44 und Calu-3 Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

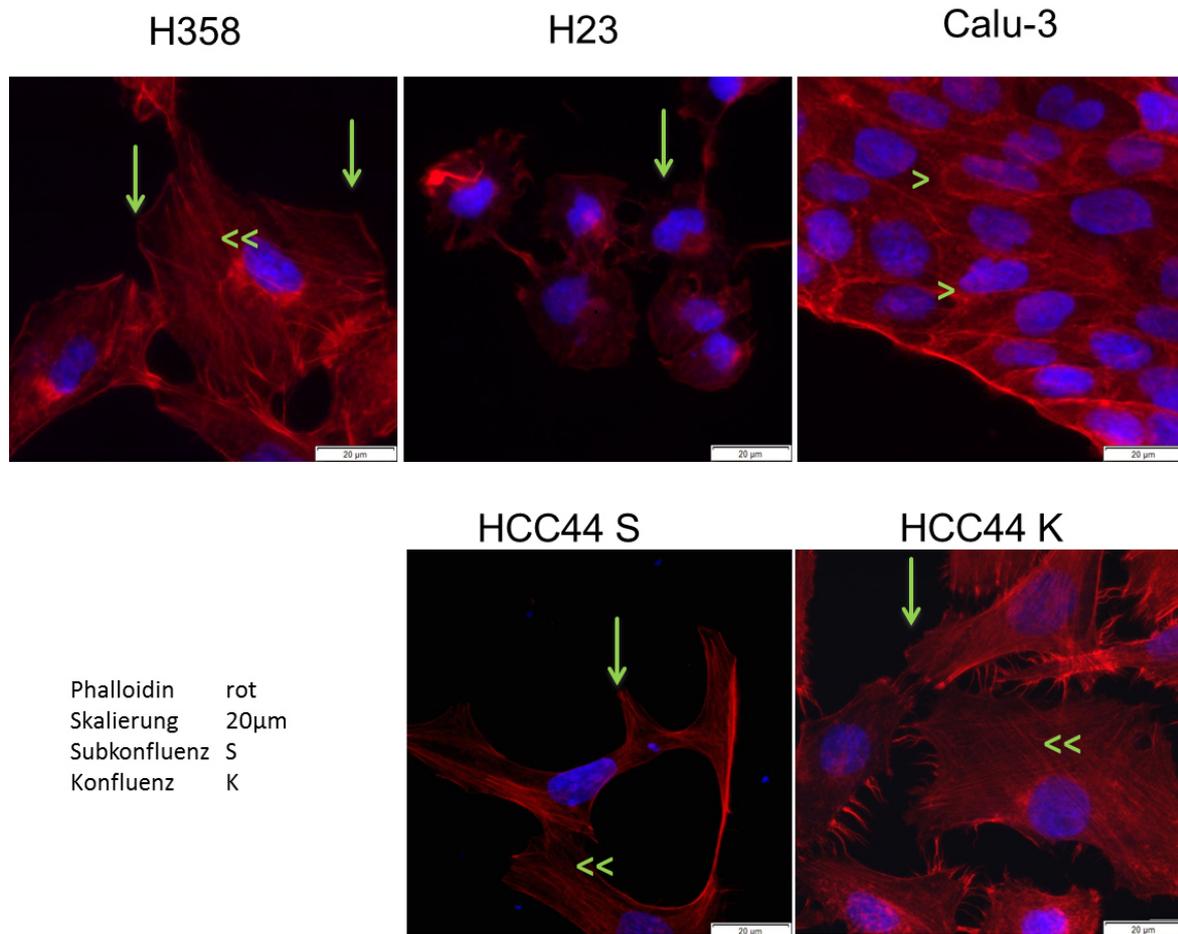


Abbildung 9: Analyse des Aktinzytoskeletts ausgewählter Adenokarzinomzelllinien der Lunge.

Darstellung filamentösen Aktins mittels Phalloidin in rot. In H358-Zellen lassen sich, als typische mesenchymale Merkmale lamellipodienähnliche (↓) Strukturen nachweisen. Zudem kommt es zur Ausbildung von Aktinstressfasern (<<). Auch in den Zelllinien H23 und HCC44 zeigen sich in unterschiedlichem Maße lamellipodienähnliche (↓) Strukturen. Stressfasern (<<) sind in HCC44 nachweisbar, in H23 fehlen diese dagegen. Calu-3-Zellen zeigen einen epithelialen Phänotyp in der Aktinfärbung, gekennzeichnet durch das Fehlen von Aktinstressfasern. Aktin ist dort als zirkumferenter Ring (>) nachweisbar. Zur Lokalisation der Zellkerne wurde gleichzeitig mit DAPI gefärbt, welches sich blau darstellt.

Wie bereits in Abbildung 3 dargestellt, zeigen die untersuchten Zelllinien erhebliche Unterschiede in ihrer Morphologie. Die Darstellung des Aktinzytoskeletts zeigt weitere Unterschiede auf.

H358 Zellen stellen sich durch viele lamellipodienähnliche Strukturen (↓ in Abbildung 9) dar. Zudem zeigen sich Aktinstressfasern (<< in Abbildung 9). Solche Strukturen werden im Rahmen der Zellmigration gebildet und deuten auf eine EMT hin. H23-Zellen zeigen ebenso lamellipodienähnlichen Strukturen (↓ in Abbildung 9). Aktinstressfasern lassen sich dort nicht nachweisen. In HCC44-Zellen sind lamellipodienähnliche Strukturen (↓ in Abbildung 9) und Aktinstressfasern nachweisbar. Calu-3-Zellen bilden als ein typisches

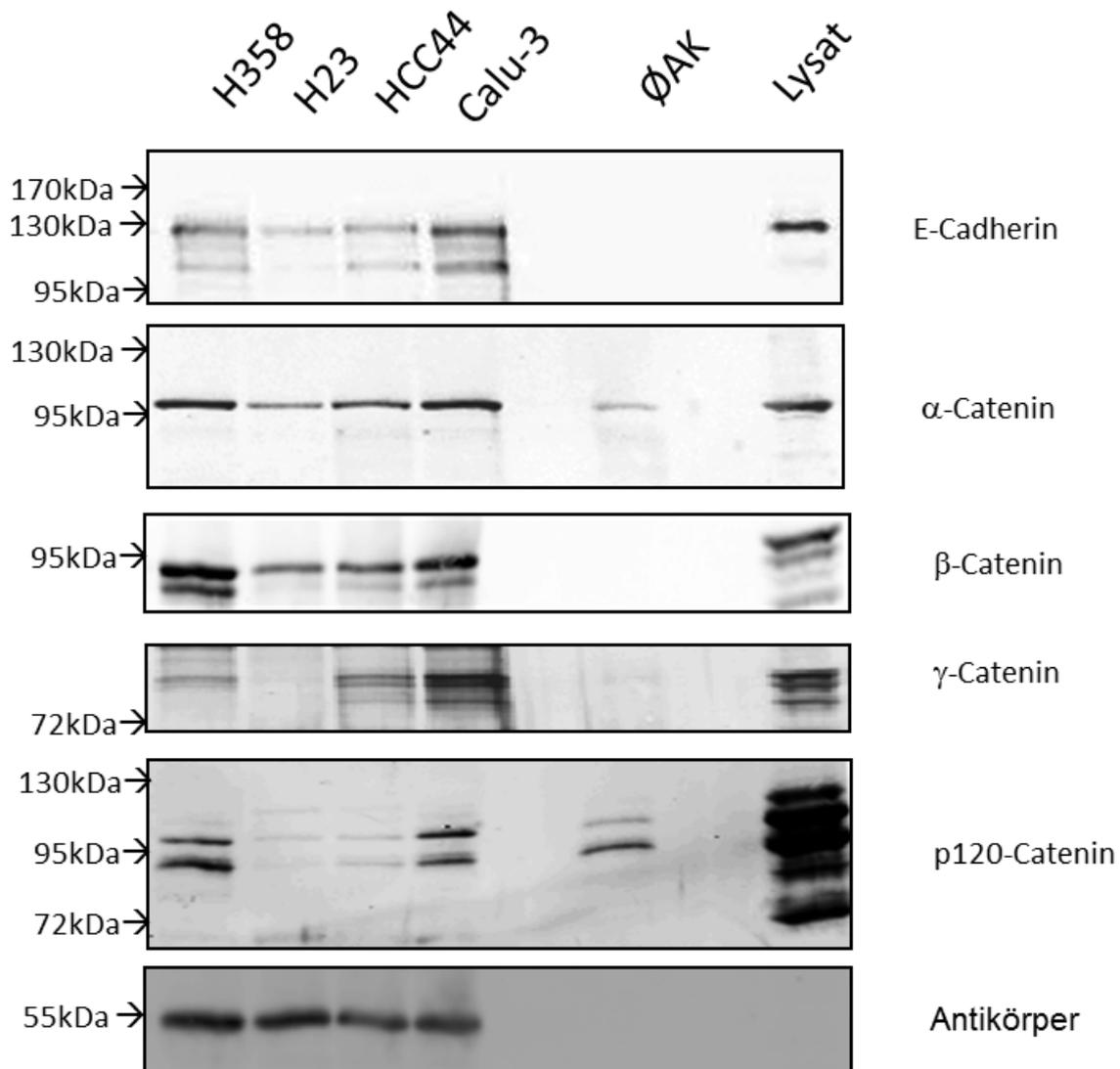
epitheliales Merkmal zirkumferentes Aktin (> in Abbildung 9) und keine nachweisbaren Stressfasern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Aktinzytoskelett in H358, H23 und HCC44 Zellen auf eine teilweise EMT hindeutet. In Calu-3 Zellen dagegen zeigt sich ein epithelialer Phänotyp.

4.7 Analyse des E-Cadherin-Catenin-Proteinkomplexes

Die Kolokalisation, dargestellt in der Immunfluoreszenz, von E-Cadherin und α -Catenin an der Membran macht das Vorhandensein eines E-Cadherin-Catenin-Komplexes wahrscheinlich, beweist diesen aber noch nicht. Denkbar wäre ebenso eine zufällige Überlagerung in der Immunfluoreszenz, ausgelöst durch eine Bindung von α -Catenin an andere Cadherine wie N-Cadherin oder P-Cadherin, welche parallel zu E-Cadherin in der Membran liegen könnten. Um die direkte oder indirekte Interaktion von E-Cadherin mit den Cateninen darzustellen, wurde im nächsten Schritt mittels Immunpräzipitation versucht, den Komplex nachzuweisen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

IP: E-Cadherin



Western Blot



Abbildung 10: Darstellung der Ergebnisse der Immunpräzipitation von E-Cadherin und dem Nachweis von komplexgebundenen Proteinen.

In der Immunpräzipitation wurden 500 µg Gesamtlisat der Zelllinien H358, H23, HCC44 und Calu-3 und 4 µl E-Cadherin Antikörper verwendet. Um unspezifische Bindungen der nachzuweisenden Proteine an die Immunpräzipitationsbeads zu beurteilen, wurde in einem weiteren Ansatz 500 µg Lysat von Calu-3 ohne E-Cadherin-Antikörper (Ø AK) präzipitiert. Nach der Präzipitation von E-Cadherin wurden E-Cadherin und vermutete Bindungspartner mittels Western Blot nachgewiesen. Um die Funktion des Antikörpers gegen die nachzuweisenden Proteine sicherzustellen, wurde 50 µg Gesamtlisat von Calu-3 (Lysat) als Kontrolle verwendet. E-Cadherin lässt sich in Calu-3 und H358 in großer Menge, in HCC44 und H23 dagegen in geringer Menge anreichern. In allen Zellen gelingt der Nachweis der Kopräzipitation von α-Catenin, β-Catenin und γ-Catenin. Die Menge von α-Catenin korreliert in den Präzipitationen mit der Menge von E-Cadherin. Die

Zelllinie Calu-3 hat viel E-Cadherin und α -Catenin, H23 dagegen wenig E-Cadherin und α -Catenin. Eine geringe Menge des nachgewiesenen α -Catenin scheint auf unspezifische Bindungen an die Beads zurückzuführen zu sein (\emptyset AK). Die Menge von β -Catenin korreliert ebenfalls mit der Menge von E-Cadherin. Im Vergleich zum Gesamtlisat, welches mindestens vier verschiedene Banden von β -Catenin zeigt, kommt es im Präzipitat hauptsächlich zur Darstellung von zwei Banden zwischen 90-94 kDa. γ -catenin ist in H23 kaum nachzuweisen, in H358 und HCC44 in mittlere Menge und in Calu-3 in großer Menge. P120ctn bindet in großen Ausmaß bereits an die Beads, ohne dass eine Anreicherung von E-Cadherin durch einen spezifischen Antikörper erfolgt ist (\emptyset AK). In den Zelllinien Calu-3 und H358 lässt sich auch unter Berücksichtigung der erwähnten unspezifischen Bindung eine Assoziation von p120ctn an E-Cadherin nachweisen. Zur Kontrolle der Gesamtmenge eingesetzten Lysates wurden 50 μ g des Gesamtlisates vor der Präzipitation auf GAPDH untersucht (Western Blot). Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen.

E-Cadherin wurde mittels Immunpräzipitation angereichert. Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die Immunpräzipitationsbeads abschätzen zu können, wurde zusätzlich eine Präzipitation ohne Antikörper durchgeführt. Nach erfolgter Präzipitation wurde zunächst E-Cadherin detektiert um nachzuweisen, ob eine Anreicherung dieses Proteins erfolgreich war. Im Anschluss wurden die vermuteten Bindungspartner im Western Blot dargestellt. Dabei wurde im gleichen Ansatz Gesamtlisat von Calu-3 (Lysat in Abbildung 10) im Western Blot mitgefärbt, um die Funktionsfähigkeit der verwendeten Antikörper sicherzustellen.

In den vier untersuchten Lungentumorzelllinien ließ sich E-Cadherin analog zu der endogen vorhanden Menge (Abbildung 4) anreichern. Eine Anreicherung von E-Cadherin war nicht erfolgt, wenn im gleichen Versuchsaufbau kein Antikörper gegen E-Cadherin verwendet wurde (\emptyset AK in Abbildung 10).

In den untersuchten Zelllinien korreliert die nachgewiesene Menge von E-Cadherin mit der kopräzipitierten Menge von α -Catenin. Bei α -Catenin zeigt sich eine geringe Menge von unspezifisch an die Präzipitationsbeads gebundenem Protein (\emptyset AK in Abbildung 10). Dies ist im vorliegenden Fall, unter Berücksichtigung der Gesamtmenge des nachgewiesenen Proteins, zu vernachlässigen.

Die Menge präzipitierten E-Cadherins korreliert zum Teil mit der Menge von kopräzipitierten β -Catenin. In H23 und HCC44 Zellen sind wenig E-Cadherin und β -Catenin nach Präzipitation nachweisbar. In Calu-3 und H358 Zellen sind viel E-Cadherin und β -Catenin nachweisbar. Geringe Abweichungen in dieser Korrelation zeigen sich bei Calu-3 Zellen, bei denen β -Catenin in geringerer Menge als in H358 Zellen nachweisbar ist, obwohl Calu-3 Zellen mehr E-Cadherin enthalten. Dieser Sachverhalt kann durch die geringere Menge von β -Catenin im Gesamtlisat begründet sein (Abbildung 5). Auffällig ist zudem, dass β -Catenin nach der Präzipitation nur mit zwei Banden nachweisbar ist, vorher jedoch mit mindestens vier. Dies zeigt, dass im E-Cadherin-Catenin-Komplex nur selektiv bestimmte Modifikationen dieses Proteins eingebaut werden.

Die Verbindung von E-Cadherin zu α -Catenin kann nicht nur durch β -Catenin, sondern auch durch γ -Catenin ermöglicht werden. Die Zelllinie Calu-3 zeigt große Mengen von

γ -Catenin nach E-Cadherin-Präzipitation. Dies kann die im Vergleich zur Zelllinie H358 geringere Menge an β -Catenin im Komplex erklären. H358 und HCC44 Zellen bauen wenig, H23 kein γ -Catenin in den E-Cadherin-Catenin-Komplex ein.

Leider ließ sich trotz mehrerer Modifikationen des Versuchsaufbaus z.B. über Variationen der genutzten Waschschriffe oder der verwendeten Gesamtlysatzmenge, kein klares Ergebnis für p120ctn erzielen. In allen Versuchsreihen kam es zum Nachweis einer geringen Bindung von p120ctn an den präzipitierten Komplex. Im Vergleich zur Menge von p120ctn im Gesamtlysatz von Calu-3 (Lysatz in Abbildung 10) ist der präzipitierte Anteil jedoch sehr gering. Zudem lässt sich eine deutliche unspezifische Bindung an die Immunpräzipitationsbeads ohne E-Cadherin-Antikörper nachweisen (\emptyset AK in Abbildung 10). Nach Berücksichtigung dieser unspezifischen Bindung bleibt unklar, wieviel p120ctn im Komplex vorhanden ist. Von einer Bindung von p120ctn an E-Cadherin ist in Calu-3 und H358 auszugehen. In H23 und HCC44 kann diese Assoziation aufgrund der vorliegenden Ergebnisse verneint werden.

Auffällig ist, dass nur wenige Isoformen von p120ctn präzipitiert werden. Im Gesamtlysatz von Calu-3 (Lysatz in Abbildung 10 oder Abbildung 5) sind teilweise vier und mehr Banden nachweisbar, in der Immunpräzipitation von Calu-3 und H358 dagegen nur zwei. Die Isoformen, welche kopräzipitiert werden, decken sich allerdings mit den Isoformen in der Präzipitation ohne AK (\emptyset AK in Abbildung 10). Die nachgewiesenen p120ctn-Isoformen kommen bei ca. 100 und 90 kDa zur Darstellung. Es könnte sich damit um die Isoform 3 von p120ctn bzw. einer Modifikation dieser handeln.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten Zelllinien einen E-Cadherin-Catenin-Komplex bestehend aus E-Cadherin, β - oder γ -Catenin und α -Catenin bilden. Das Vorhandensein von p120ctn im E-Cadherin-Catenin-Komplex variiert hingegen in den verschiedenen Zelllinien.

4.8 Assoziation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Zytoskelett

Die epitheliale Zell-Zell-Adhäsion wird durch die Assoziation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes an das Aktinzytoskelett moduliert. Eine Möglichkeit die Assoziation von E-Cadherin und den Cateninen mit dem Aktinzytoskelett nachzuweisen, besteht in der Anwendung der Tritonfraktionierung. In der tritonunlöslichen Fraktion finden sich Proteine, welche an das Zytoskelett gebunden sind, in der tritonlöslichen Fraktion dagegen solche, die keine Bindung mit dem Zytoskelett eingehen. Abbildung 11 bildet die Ergebnisse der Fraktionierung der Zelllinien H358, H23 und Calu-3 ab.

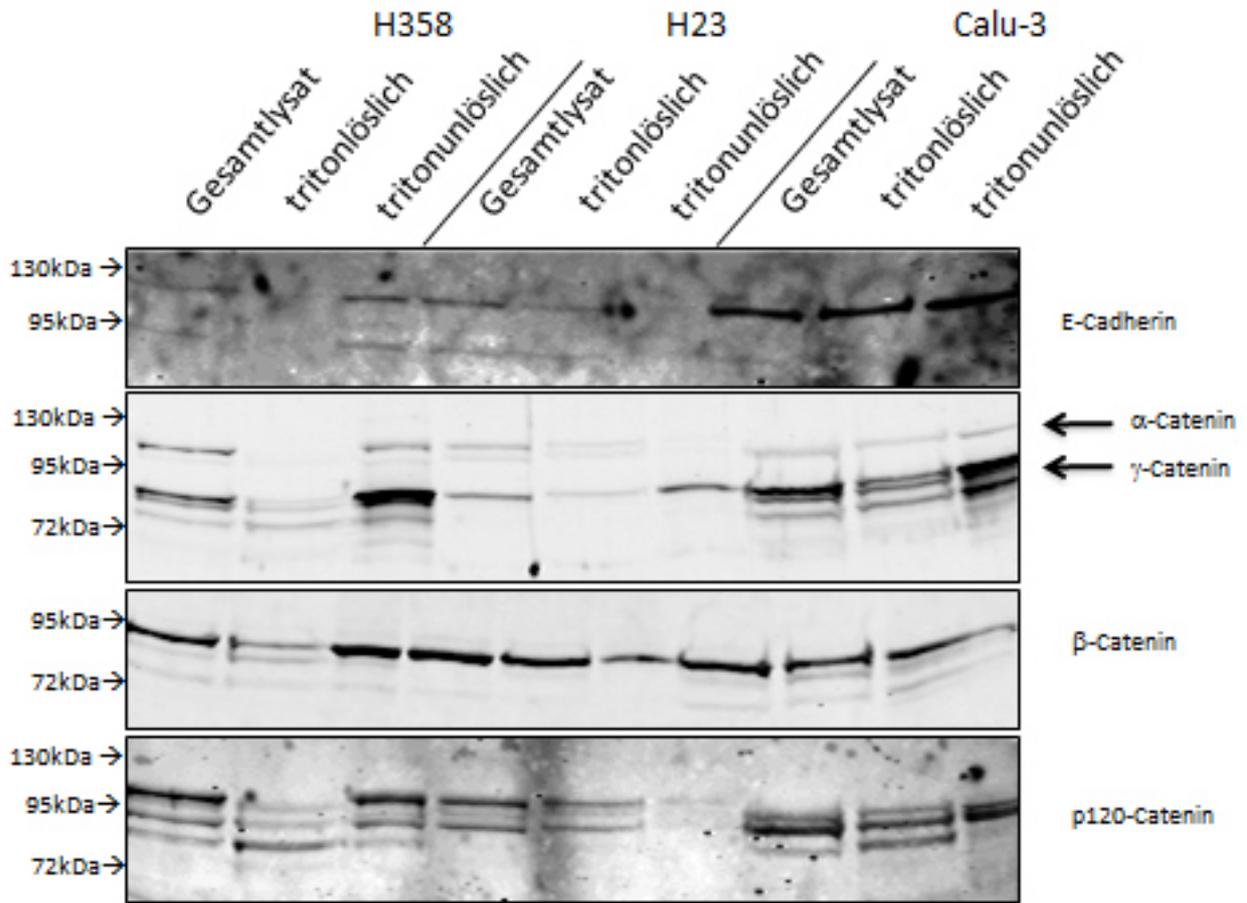


Abbildung 11: Tritonfraktionierung verschiedener Adenokarzinomzelllinien der Lunge.

Es wurden die Zelllinien H358, H23 und Calu-3 analysiert. Der Nachweis der zu detektierenden Proteine erfolgte im Gesamtlysat, in der tritonlöslichen und in der tritonunlöslichen Fraktion. Der Nachweis im Gesamtlysat beschreibt die Gesamtmenge des Proteins in den Zellen, der Nachweis in der tritonlöslichen Fraktion die Menge von Proteinen, welche nicht mit dem Zytoskelett verbunden sind. In der tritonunlöslichen Fraktion finden sich Proteine mit Assoziation zum Zytoskelett. E-Cadherin ist in H358-Zellen in größerer Menge in der tritonunlöslichen Fraktion als in der tritonlöslichen Fraktion zu finden. In der Zelllinie Calu-3 scheinen äquivalente Mengen in der tritonlöslichen und tritonunlöslichen Fraktion vorhanden zu sein. In H23-Zellen ist der überwiegende Teil von E-Cadherin in der tritonlöslichen Fraktion nachzuweisen. Die Menge von α -Catenin korreliert in allen Zelllinien mit der Menge von E-Cadherin in den jeweiligen Fraktionen. γ -Catenin zeigt ein ähnliches Verteilungsmuster wie E-Cadherin in den Zelllinien H358 und Calu-3. In H23-Zellen dagegen ist viel γ -Catenin in der tritonunlöslichen Fraktion, obwohl E-Cadherin überwiegend in der tritonlöslichen Fraktion zu finden ist. Die Menge von β -Catenin korreliert mit E-Cadherin in allen untersuchten Zelllinien über die untersuchten Fraktionen hinweg. P120ctn zeigt sich in den Zelllinien H358 und Calu-3 in großer Menge in der tritonunlöslichen Fraktion. In H23-Zellen ist p120ctn dagegen hauptsächlich in der tritonlöslichen Fraktion nachweisbar.

Dargestellt sind drei Proben für jede untersuchte Zelllinie. Der Nachweis im Gesamtlysat dient als Referenz, um die ermittelten Werte einordnen zu können. Jede Zelllinie ist einmal mit der tritonlöslichen Fraktion und einmal mit der tritonunlöslichen Fraktion dargestellt.

E-Cadherin ist in H358-Zellen in großen Mengen in der tritonunlöslichen Fraktion zu finden. Ähnlich sieht dies bei Calu-3-Zellen aus, wobei diese Zelllinie auch sehr viel E-Cadherin in der tritonlöslichen Fraktion enthält. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zelllinien H358 und Calu-3 einen E-Cadherin-Catenin-Komplex mit Assoziation zum

Aktinzytoskelett bilden. In H23-Zellen ist der überwiegende Anteil von E-Cadherin in der tritonlöslichen Fraktion zu finden und somit nicht mit dem Zytoskelett assoziiert. Die Menge von α -Catenin in der jeweiligen Fraktion (Gesamtlysat, tritonlöslich oder tritonunlöslich) korreliert mit der dazugehörenden Menge an E-Cadherin. α -Catenin dient als Verbindung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Aktinzytoskelett. Die Verbindung von α -Catenin mit E-Cadherin geschieht über β - oder γ -Catenin.

Die Menge von β -Catenin und γ -Catenin korreliert in allen Zelllinien, außer H23, mit der Menge von E-Cadherin in der jeweiligen Fraktion. In H23-Zellen ist jedoch γ -Catenin in der tritonunlöslichen Fraktion enthalten, obwohl E-Cadherin mehrheitlich in der tritonlöslichen Fraktion nachweisbar war. Das γ -Catenin der tritonunlöslichen Fraktion scheint hier über andere Strukturen als E-Cadherin an das Zytoskelett verankert zu sein. Denkbar wären hier Desmosomen oder andere Cadherine wie z.B. N-Cadherin.

Obwohl p120ctn in den Immunpräzipitationen nicht, bzw. nur eingeschränkt im E-Cadherin-Catenin-Komplex nachweisbar ist, sind in den Zelllinien H358 und Calu-3 p120ctn in der tritonunlöslichen Fraktion nachweisbar, was auf eine Verbindung mit einem E-Cadherin-Catenin-Komplex hindeuten kann. Andererseits ist auch hier möglich, dass p120ctn über z.B. N-Cadherin an das Zytoskelett assoziiert ist. In H23-Zellen ist der größte Teil des detektierten p120ctn in der tritonlöslichen Fraktion nachweisbar, was auf eine zytosolische Lokalisation dieses Proteins hinweist.

In den untersuchten drei Zelllinien zeigen sich trotz vorhandenem E-Cadherin Unterschiede in der Assoziation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Zytoskelett.

4.9 Analyse weiterer Interaktionspartner des E-Cadherin-Catenin-Komplexes

Ziel dieser Arbeit war es zudem, weitere Interaktionspartner des E-Cadherin-Catenin-Komplexes zu finden. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass E-Cadherin z.B. mit verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR, FGFR oder IGFR assoziiert ist und so Einfluss auf die Signaltransduktion der Zelle nehmen kann. Bei der Bildung und beim Umbau des E-Cadherin-Catenin-Komplexes, z.B. im Rahmen der Zellmigration, ist eine gleichzeitige Modulation des Aktinzytoskeletts nachweisbar. Als ein Interaktionspartner, der diese Modulation des Aktinzytoskeletts beeinflusst, ist p190-Rho-GAP beschrieben worden. Im nächsten Schritt wurde daher versucht, die genannten Rezeptortyrosinkinasen und p190-Rho-GAP im Komplex mit E-Cadherin nachzuweisen. Dafür wurden zunächst die Zelllinien H358, H23, HCC44 und Calu-3 auf ihren Gehalt der genannten Proteine im Gesamtlysat untersucht.

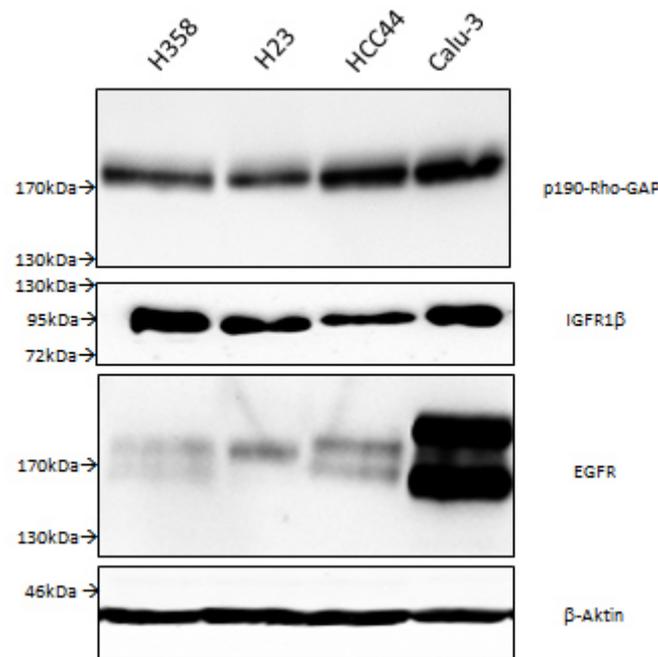


Abbildung 12: Analyse der Proteinexpression von p190-Rho-GAP, IGFR1 β und EGFR verschiedener Adenokarzinomzelllinien der Lunge mittels Western Blot.

In allen untersuchten Zelllinien lassen sich die genannten Proteine darstellen. p190-Rho-GAP ist in allen untersuchten Adenokarzinomzelllinien in gleicher Menge nachweisbar. Eine ähnliche Proteinexpression zeigt sich in den untersuchten Zellen für den Rezeptor IGFR1 β , wobei eine leicht erhöhte Expression in den Zelllinien H358 und Calu-3 feststellbar ist. EGFR ist in Calu-3-Zellen in deutlich erhöhter Menge und zudem mit einem erhöhten Molekulargewicht darstellbar. β -Aktin dient als Beladungskontrolle. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Es wurden p190-Rho-GAP, EGFR und IGFR1 β untersucht. FGFR1 ließ sich aufgrund großer Diskrepanzen in den Ergebnissen bei Verwendung verschiedener Antikörper und widersprüchlichen Ergebnissen zwischen verschiedenen Western Blots und Immunpräzipitationen nicht auswerten. Daher wird auf eine Darstellung verzichtet.

Alle untersuchten Zelllinien bilden vergleichbare Mengen von p190-Rho-GAP. Ebenso ist IGFR1 β in untersuchten Adenokarzinomzelllinien auf gleichem Niveau nachweisbar, lediglich mit leicht erhöhter Tendenz bei H358 und Calu-3. Calu-3 Zellen zeigen im Vergleich zu den anderen drei untersuchten Zelllinien einen deutlich höheren Gehalt von EGFR und zudem ein EGFR-Protein mit einem erhöhten Molekulargewicht. Dies kann auf eine verstärkte Phosphorylierung und damit einhergehend einer höheren Aktivität des Rezeptors hinweisen. Möglich ist zudem eine Mutation des Rezeptors oder eine Unspezifität des verwendeten Antikörpers.

Um eine Assoziation von p190-Rho-GAP, IGFR1 β und EGFR mit E-Cadherin zu untersuchen, wurde analog zum Nachweis der Catenine im Komplex zunächst eine Immunfluoreszenz angefertigt. Mittels der Immunfluoreszenz kann eine Kollokalisierung der genannten Proteine mit E-Cadherin, als ein erster Hinweis auf eine direkte oder indirekte

Assoziation, dargestellt werden. Da in Calu-3 große Mengen von E-Cadherin nachgewiesen wurden, wurde die Immunfluoreszenzuntersuchung mit dieser Zelllinie durchgeführt. In der anschließenden Immunpräzipitation wurden die Zelllinien H358, H23, HCC44 und Calu-3 untersucht. In der Zelllinie Calu-3 wurde des Weiteren der Einfluss einer zehnmütigen Stimulation durch EGF (10 ng/ml) und IGF (10 ng/ml) auf die Assoziation von EGFR bzw. IGFR1 β mit E-Cadherin untersucht.

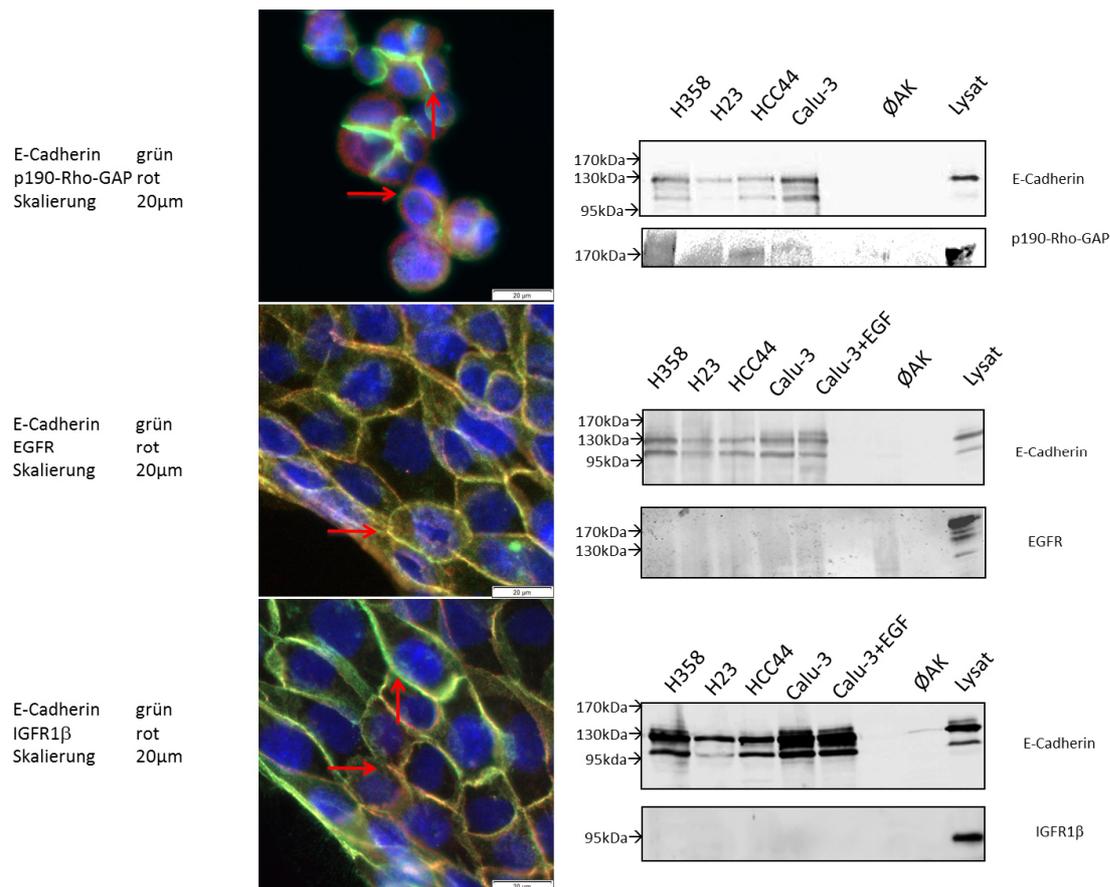


Abbildung 13: Analyse weiterer Interaktionspartner von E-Cadherin mittels Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation.

Mittels Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von E-Cadherin und p190-Rho-GAP, EGFR bzw. IGFR1 β dargestellt. In Bereichen von Zell-Zell-Kontakten kommt es in der analysierten Zelllinie Calu-3 zu einer verstärkten Detektion von E-Cadherin (grün). Die analysierten Interaktionspartner (p190-Rho-GAP, EGFR und IGFR1 β) sind in rot dargestellt und zeigen in den Bereichen von Zell-Zell-Kontakten teilweise eine Kolokalisation mit E-Cadherin (\rightarrow), welche sich durch eine Überlagerung der beiden Aufnahmekanäle in orange zeigt. Insbesondere beim gleichzeitigen Nachweis von EGFR und E-Cadherin zeigt sich durchgehend eine Kolokalisation beider Proteine. Beim Nachweis von IGFR1 β und p190-Rho-GAP gemeinsam mit E-Cadherin existieren dagegen auch Bereiche, in denen IGFR1 β bzw. p190-Rho-GAP keine Anreicherung in der Membran zeigen, trotz Nachweis von E-Cadherin (\uparrow). Zur Lokalisation der Zellkerne wurde gleichzeitig mit DAPI gefärbt, welches sich in blau darstellt.

In der Immunpräzipitation wurden 1000 μ g Gesamtlisat der Zelllinien H358, H23, HCC44 und Calu-3 und 4 μ l E-Cadherin Antikörper verwendet. Um unspezifische Bindungen der nachzuweisenden Proteine an die Immunpräzipitationsbeads auszuschließen, wurde in einem zusätzlichen Ansatz 1000 μ g Gesamtlisat von Calu-3 ohne E-Cadherin-Antikörper (\emptyset AK) inkubiert. Nach der Präzipitation wurden E-Cadherin und p190-Rho-GAP, EGFR bzw. IGFR1 β mittels Western Blot detektiert. Um die Funktion des Antikörpers gegen die nachzuweisenden Proteine sicherzustellen, wurden 50 μ g Gesamtlisat von Calu-3 (Lysat) als Kontrolle verwendet. Beim Nachweis von EGFR bzw. IGFR1 β wurden zusätzlich Calu-3-Zellen genutzt, welche 10 Minuten mit 10 ng/ml EGF bzw. IGF stimuliert worden sind. Die Anreicherung von E-Cadherin funktionierte in den untersuchten Zelllinien problemlos. In keiner Zelllinie ist IGFR1 β oder EGFR im E-Cadherin-Präzipitat

nachweisbar. p190-Rho-GAP ist in den Zelllinien H358 und HCC44 in geringer Menge nach E-Cadherin Präzipitation nachweisbar. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

E-Cadherin (grün) kommt in Bereichen der Zell-Zell-Adhäsion in der Membran verstärkt zur Anfärbung. p190-Rho-GAP, IGFR1 β und EGFR (rot) sind ebenfalls in Bereichen der Zell-Zell-Adhäsion in Calu-3-Zellen anzufärben. Bei Überlagerung der beiden Aufnahmekanäle zeigt sich eine mögliche Kolo-kalisation der nachzuweisenden Proteine durch orange Farbe (\rightarrow in Abbildung 13). Beim gleichzeitigen Nachweis von E-Cadherin und EGFR zeigt sich eine durchgehende Kolo-kalisation der beiden Proteine in der Membran. p190-Rho-GAP und IGFR1 β dagegen sind nur in Teilbereichen mit E-Cadherin kolo-kalisiert, in anderen Bereichen der Membran ist nur E-Cadherin nachweisbar (\uparrow in Abbildung 13). Eine vorhandene Kolo-kalisation kann auf eine indirekte oder direkte Assoziation der genannten Proteine hinweisen. Daher wurde mittels Immunpräzipitation und Anreicherung von E-Cadherin versucht die vermuteten Interaktionspartner nachzuweisen.

In allen untersuchten Zelllinien war die Anreicherung von E-Cadherin aus 1000 μ g Gesamtlysat spezifisch möglich. Um unspezifische Bindungen der gesuchten Interaktionspartner an die Immunpräzipitationsbeads zu detektieren, wurde zudem Gesamtlysat aus Calu-3 ohne spezifischen Antikörper gegen E-Cadherin inkubiert (\emptyset AK in Abbildung 13).

Der Nachweis von EGFR bzw. IGFR1 β im E-Cadherin-Präzipitat war trotz Kolo-kalisation mit E-Cadherin in der Immunfluoreszenz nicht möglich. In der Membran vorhandenes EGFR bzw. IGFR1 β scheint in keiner Assoziation mit E-Cadherin vorzuliegen. Die zehnmünütige Stimulation mit EGF (10 ng/ml) bzw. IGF (10 ng/ml) bewirkte keine Assoziation der untersuchten Rezeptortyrosinkinasen an E-Cadherin.

p190-Rho-GAP war in den Zelllinien H358 und HCC44 im Komplex mit E-Cadherin nachweisbar. In den Zelllinien H23 und Calu-3 konnte dieser Nachweis nicht erbracht werden.

4.10 Analyse der Aggregationsfähigkeit von NSCLC

Um die calciumabhängige Zell-Zell-Adhäsion, welche durch Cadherine gebildet wird, zu untersuchen, wurden Aggregationsassays durchgeführt. Im gewählten Untersuchungsaufbau war es möglich, durch Vergleich der Aggregationsfähigkeit mit Calcium und unter Calciumentzug durch EDTA, den Effekt der Cadherine auf die Adhäsion zu untersuchen. Durch diesen Untersuchungsaufbau war es nicht möglich die Effekte von E-Cadherin, N-Cadherin sowie weiteren Cadherinen getrennt voneinander zu betrachten.

Nachdem die Zellen vereinzelt wurden, wurde deren Aggregation nach definierten Zeiten gemessen und daraus auf die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion untereinander geschlossen. Um die Aggregation mit anderen Zelllinien zu vergleichen, wurde zudem die Pankreaskarzinomzelllinie BxPC3, eine Zelllinie deren Aggregation bereits in der Literatur beschrieben worden ist, untersucht. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine sehr starke Aggregation aus. Im Versuch stellte sich heraus, dass sich BxPC3-Zellen kaum vereinzeln ließen. Nach 60 Minuten zeigten sich große Aggregate (↑ in Abbildung 14) und die Anzahl an Einzelzellen (→ in Abbildung 14) nahm entsprechend ab. Der Aggregationsindex betrug zu diesem Zeitpunkt $0,698 \pm 0,047$.

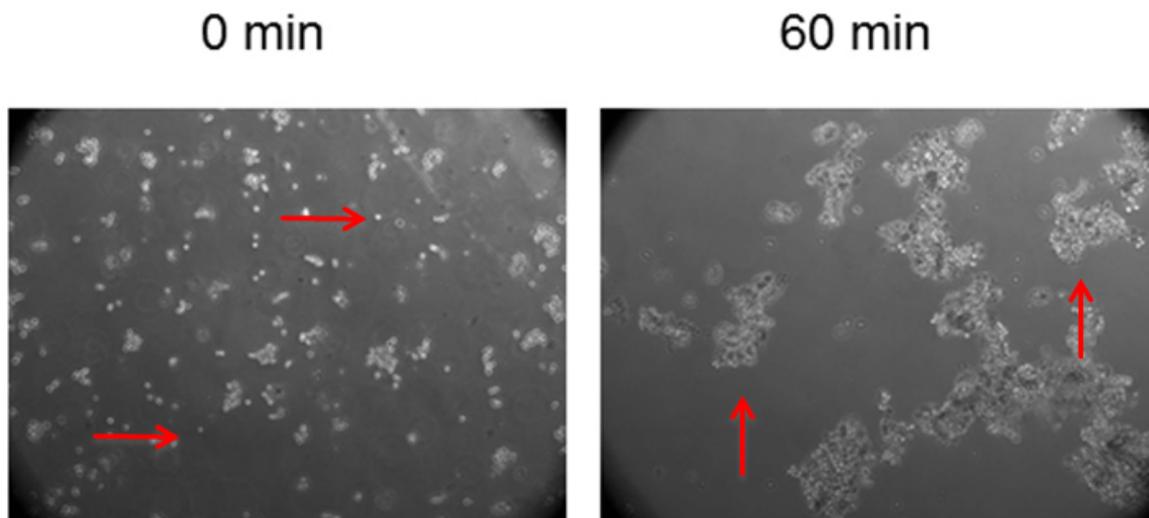


Abbildung 14: Aggregation der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC3.

Dargestellt sind zwei repräsentative Abbildungen nach 0 Minuten und 60 Minuten. Deutlich erkennbar ist die Abnahme von Einzelzellen (→) und die Zunahme von großen Aggregaten (↑) im Laufe des Versuchs. Für die Berechnung der Aggregation wurde ein Punkt für eine Einzelzelle oder ein Aggregat vergeben und der Aggregationsindex mit der Formel $\text{Index} = (P_0 - P_{60 \text{ min}}) / P_{0 \text{ min}}$ berechnet.

Durch die Zugabe von EDTA, welches Calciumionen aus der Lösung bindet und damit die Cadherin-vermittelte Adhäsion auflöst, konnte der Aggregationsindex von BxPC3 auf einen Wert von $0,566 \pm 0,063$ reduziert werden. Die Differenz der Aggregationsindices vor und nach EDTA-Zugabe kann als Maß für die Adhäsion durch Cadherine dienen.

Die untersuchten NSCLC-Zellen zeigten im Vergleich zu BxPC3 eine geringere Aggregationsfähigkeit. Eine Vereinzelnung der Zellen war problemlos möglich, eine anschließende Aggregation fand nach 15 und 30 Minuten kaum statt. Lediglich nach 60 Minuten waren geringe Unterschiede messbar. Aufgrund dessen wird im Folgenden nur auf die Werte nach 60 Minuten eingegangen.

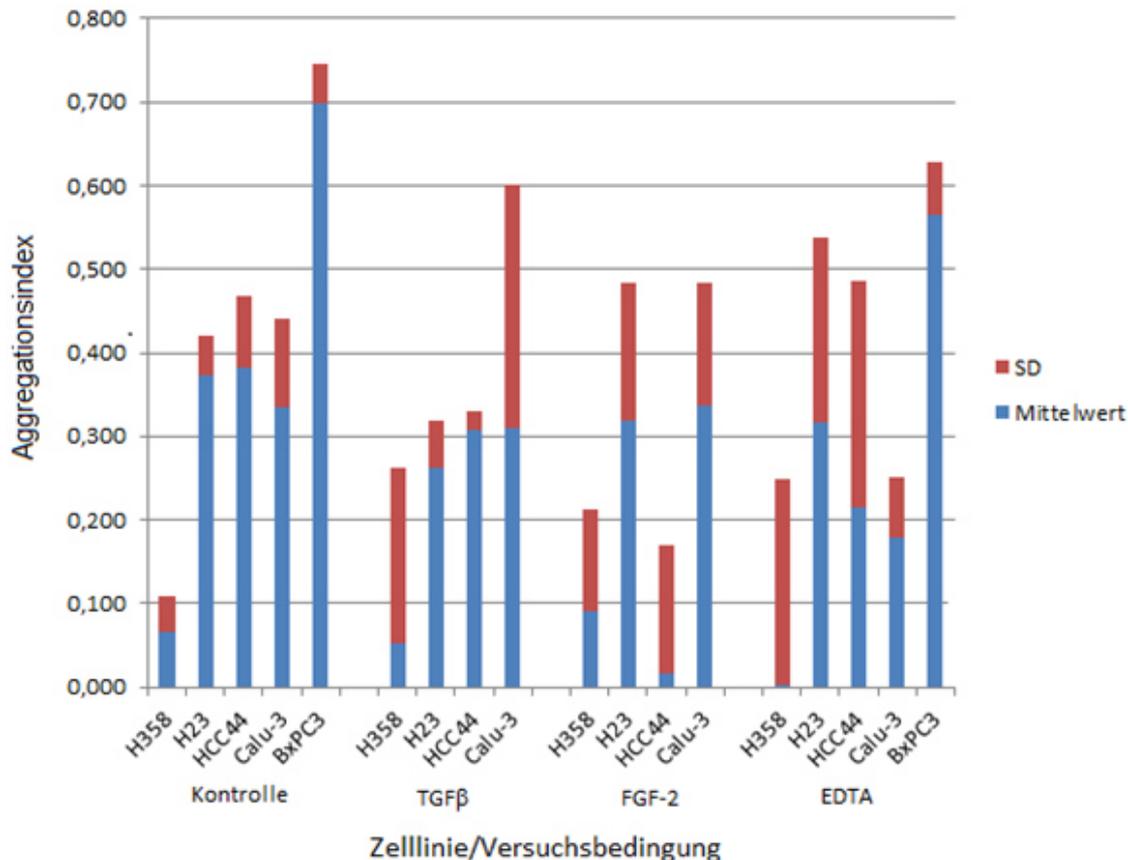


Abbildung 15: Analyse der Aggregation ausgewählter Adenokarzinomzelllinien der Lunge.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Aggregationsindices nach 60 Minuten. BxPC3-Zellen dienen als Vergleichswerte für eine starke Aggregation. H23 und HCC44-Zellen zeigen von den untersuchten Lungentumorzelllinien die größten Aggregationsindices, gefolgt von der Zelllinie Calu-3 und mit großem Abstand H358. Die erhaltenen Werte der Lungentumorzelllinien sind deutlich geringer als die Werte der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC3. Die Aggregation lässt sich in allen untersuchten Zelllinien durch Calciumentzug (EDTA) herabsetzen, wenn auch in einer großen Variationsbreite. Insbesondere H23-Zellen werden durch Calciumentzug in ihrer Aggregation kaum beeinflusst. TGFβ bewirkt eine Verringerung der Aggregation in H23- und HCC44-Zellen. FGF-2 reduziert die Aggregation der Zelllinie HCC44 deutlich und beeinflusste die Aggregation der übrigen Zelllinien kaum. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Dargestellt sind die Aggregationsindices nach 60 Minuten. Im Versuch zeigte sich zum Teil eine große Streuung der gemessenen Werte. Zudem kam es teilweise zu negativen Aggregationsindices, also zu einer Zunahme der gezählten Partikelzahl nach 60 Minuten. Dies kann auf den Zelltod einzelner Zellen und deren Fragmentierung zurück zu führen sein oder dadurch bedingt sein, dass nach dem Versuchsstart noch nicht erkannte Aggregate vorhanden waren, die sich im Laufe des Versuchs aufgelöst haben.

Obwohl H358 Zellen sehr viel E-Cadherin enthalten, zeigen sie nur einen sehr geringen Aggregationsindex (Kontrolle: $0,066 \pm 0,043$) in den Versuchen ohne Stimulation bzw. ohne Calciumentzug (im Folgenden als Kontrolle bezeichnet). Calu-3, eine Zelllinie, die ebenfalls eine große Menge von E-Cadherin auf Proteinebene (Abbildung 4) aufweist, besitzt einen höheren Aggregationsindex (Kontrolle: $0,334 \pm 0,108$) als H358, allerdings

einen nur wenig niedrigeren Aggregationsindex als die beiden Zelllinien mit wenig E-Cadherin (H23 Kontrolle: $0,373 \pm 0,048$; HCC44 Kontrolle: $0,382 \pm 0,087$).

Die Aggregation der HCC44- und H23-Zellen ist die Höchste der im Kontrollversuch gemessenen Werte der NSCLC-Zellen, allerdings im Vergleich zu BxPC3 (Kontrolle: $0,698 \pm 0,047$) vergleichsweise gering. Durch die Zugabe von EDTA ($25 \mu\text{M}$) kann vorhandenes Calcium dem Medium entzogen, und so die Adhäsion, welche calciumabhängig durch Cadherine vermittelt wird, bestimmt werden. H358-Zellen können durch Calciumentzug weiter in ihrer niedrigen Aggregationsfähigkeit reduziert werden (EDTA: $0,002 \pm 0,247$; Kontrolle: $0,066 \pm 0,043$), allerdings ist dieses Ergebnis aufgrund der großen Standardabweichung nur eingeschränkt verwertbar. Calu-3-Zellen (EDTA: $0,180 \pm 0,071$; Kontrolle: $0,334 \pm 0,108$) und HCC44-Zellen (EDTA: $0,214 \pm 0,270$; Kontrolle: $0,382 \pm 0,087$) werden in ihrer Adhäsion durch EDTA ebenfalls geschwächt, behalten aber im Vergleich zu H358 ein hohes Niveau aufrecht. Die Zelllinie H23 (EDTA: $0,316 \pm 0,222$; Kontrolle: $0,373 \pm 0,048$) zeigt nur eine geringe Verringerung der Aggregationsfähigkeit durch Calciumentzug. Durch die Zugabe von TGF β (10 ng/ml) kann in den Zelllinien H23 (TGF β : $0,261 \pm 0,059$; Kontrolle: $0,373 \pm 0,048$) und HCC44 (TGF β : $0,307 \pm 0,023$; Kontrolle: $0,382 \pm 0,087$) eine Verringerung der Aggregation im Vergleich zum Kontrollversuch ohne Stimulation gefunden werden. Die Zelllinien Calu-3 (TGF β : $0,311 \pm 0,289$; Kontrolle: $0,334 \pm 0,108$) und H358 (TGF β : $0,053 \pm 0,209$; Kontrolle: $0,066 \pm 0,043$) zeigen keine relevante Veränderung ihrer Aggregation unter TGF β -Stimulation.

Ein deutlicher Effekt ist durch FGF-2-Stimulation (10 ng/ml) für die Zelllinie HCC44 feststellbar. Die Aggregation von HCC44-Zellen (FGF-2: $0,017 \pm 0,152$; Kontrolle: $0,382 \pm 0,087$) wird nahezu komplett aufgehoben. H358-Zellen (FGF-2: $0,091 \pm 0,121$; Kontrolle: $0,066 \pm 0,043$), H23-Zellen (FGF-2: $0,319 \pm 0,165$; Kontrolle: $0,373 \pm 0,048$) und Calu-3-Zellen (FGF-2: $0,337 \pm 0,146$; Kontrolle: $0,334 \pm 0,108$) zeigen dagegen unter FGF-2-Stimulation ähnliche Aggregationsindices wie im Kontrollversuch.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zelllinien Calu-3, HCC44 und H358 ein großen Teil ihrer Aggregation calciumabhängig gestalten. H23-Zellen dagegen scheinen dies nur im geringen Maße zu tun. Durch Stimulation mit TGF β zeigt sich in den Zelllinien H23 und HCC44 eine Verringerung der Aggregationsfähigkeit. Die Stimulation mit FGF-2 bewirkt einen stark negativen Effekt auf die Aggregationsfähigkeit von HCC44-Zellen und nur eine sehr geringe Beeinflussung der Aggregation der Zelllinien H358, H23 und Calu-3.

4.11 Analyse der Migration von NSCLC-Zellen im Wundheilungsassay

Die Migration ist ein weiterer zellulärer Vorgang, der durch Zell-Zell-Kontakte und durch Signalmoleküle, wie z.B. TGF β , beeinflusst werden kann. Um den Einfluss von TGF β auf

die Migration von NSCLC-Zellen zu untersuchen, wurden Wundheilungsassays durchgeführt. In konfluente Zellverbände wurde dabei eine Wunde von ca. 350 μm Breite gesetzt und der Grad des Verschlusses dieser Wunde nach 24 und 48 Stunden bestimmt. Abbildung 16 zeigt exemplarisch mikroskopische Bilder dieses Versuches am Beispiel von Calu-3-Zellen.

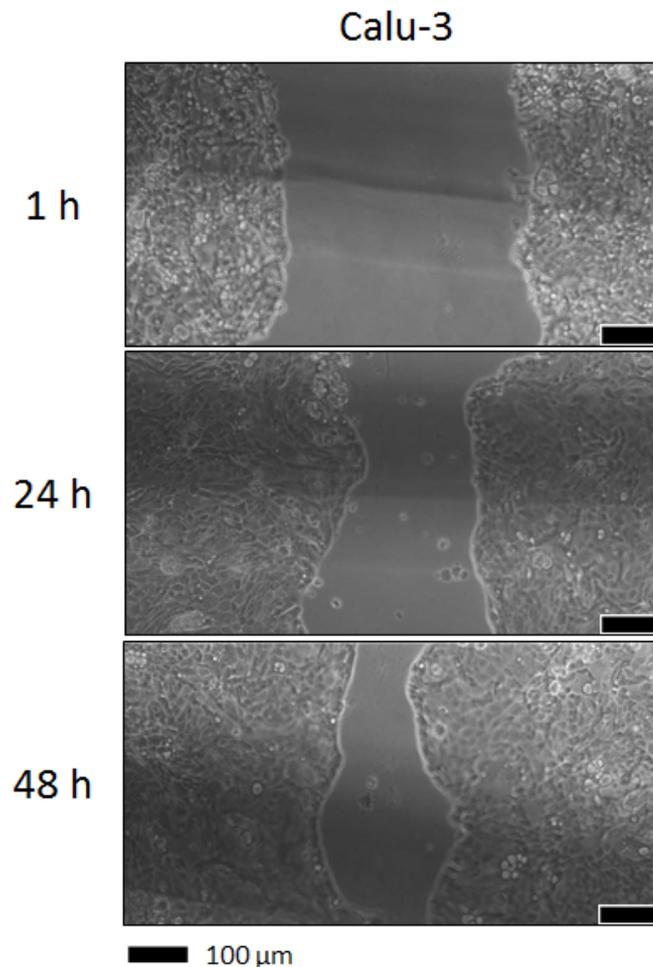


Abbildung 16: Mikroskopische Darstellung des Wundheilungsassay.

Darstellung nach einer Stunde, 24 Stunden, sowie 48 Stunden nach Setzen des Spaltes. In konfluent gewachsenen Zellrasen wurde mittels Pipettenspitze ein 350 μm großer Spalt gesetzt und die Veränderung der Spaltbreite nach 24 und 48 Stunden bestimmt.

Um den Einfluss von TGF β auf die Migration von Lungenkrebszelllinien zu untersuchen, wurde im Wundheilungsassay das Ausmaß der Migration unter TGF β -Stimulation (2,5 ng/ml oder 7,5 ng/ml) bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden verglichen mit den Werten im unstimulierten Wundheilungsassay. Die Ergebnisse nach 24 Stunden und 48 Stunden zeigen die Abbildungen 17 und 18. Die erhaltenen Messwerte ohne Stimulation wurden als 100% definiert. Dargestellt ist die Abweichung der TGF β -stimulierten Zellen von Zellen ohne Stimulation. Ein Wert über 100% spricht für eine schnellere Reduktion der

Spaltbreite zum angegebenen Zeitpunkt und somit einer schnelleren Migration unter TGF β -Stimulation.

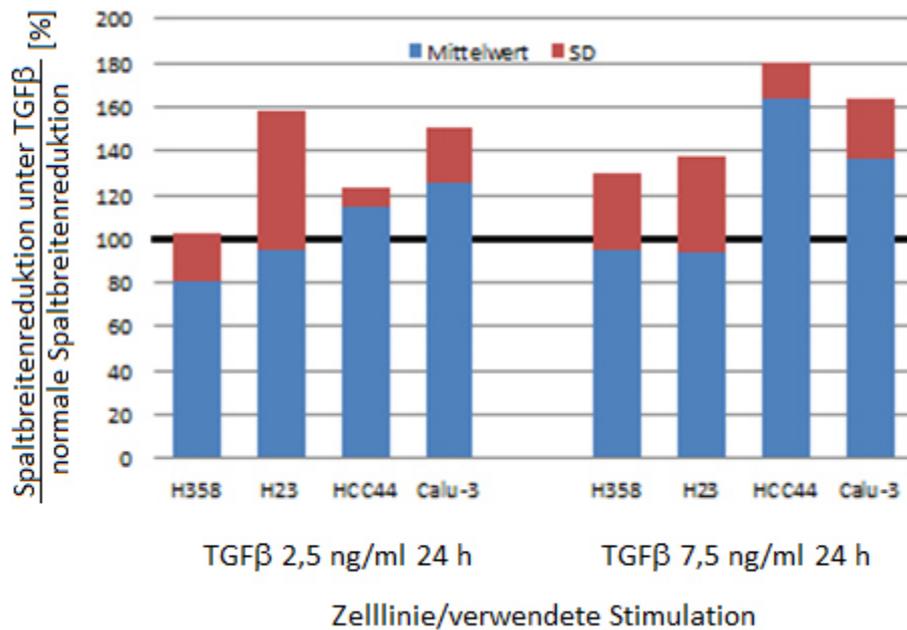


Abbildung 17: Einfluss verschiedener Konzentrationen von TGF β auf die Migration von NSCLC-Zelllinien nach 24 Stunden.

Unter Stimulation mit 2,5 ng/ml TGF β kommt es zur langsameren Reduktion der Spaltbreite in den Zelllinien H358 und H23. Bei HCC44 und Calu-3 Zellen wird die Spaltbreite stärker reduziert. Unter Stimulation mit erhöhter Dosis (7,5 ng/ml) nimmt das Ausmaß des Wundverschlusses von H358- und H23-Zellen geringgradig ab, wohingegen der Wundverschluss bei den Zelllinien HCC44 und Calu-3 stark zunimmt, sowohl im Vergleich zu den Ausgangswerten ohne Stimulation als auch zum Versuch mit 2,5 ng/ml TGF β -Stimulation. Dargestellt ist die TGF β -induzierte Spaltreduktion im Verhältnis zur Kontrolle. Werte über 100% entsprechen einer schnelleren Reduktion der Spaltbreite im Vergleich zur unstimulierten Versuchsdurchführung. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

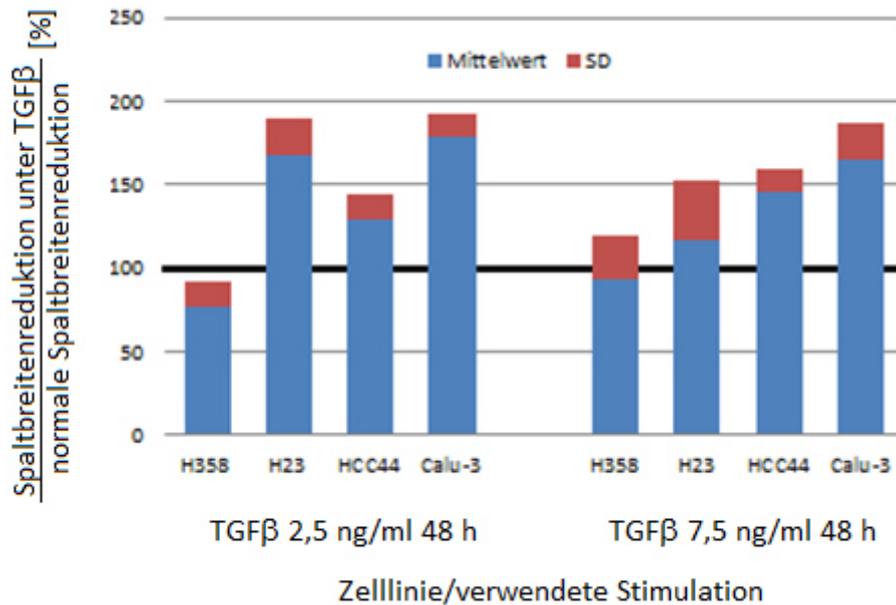


Abbildung 18: Einfluss verschiedener Konzentrationen von TGFβ auf die Migration von NSCLC-Zelllinien nach 48 Stunden.

H358-Zellen zeigen nach 48 Stunden eine verringerte Reduktion der Spaltbreite, sowohl für 2,5 ng/ml als auch für 7,5 ng/ml TGFβ. Bei einer Stimulation mit 2,5 ng/ml sind die erhaltenen Werte für die Zelllinien H23 und Calu-3 auf 170% und 180% und für die Zelllinie HCC44 auf 130% erhöht. Bei einer Stimulation mit 7,5 ng/ml TGFβ ist das Ausmaß des Wundverschlusses von H23-Zellen auf 120%, von HCC44-Zellen auf 140% und von Calu-3-Zellen auf 160% erhöht. Dargestellt ist die TGFβ-induzierte Spaltreduktion im Verhältnis zur Kontrolle. Werte über 100% entsprechen einer schnelleren Reduktion der Spaltbreite im Vergleich zur unstimulierten Versuchsdurchführung. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

H358-Zellen zeigen sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden unter Stimulation mit 2,5 ng/ml bzw. 7,5 ng/ml TGFβ einen auf 80% bzw. 95% reduzierten Wundverschluss. H23-Zellen zeigen nach 24 Stunden für beide getesteten Konzentrationen Werte im Bereich von 95%. Nach 48 Stunden kommt es unter Stimulation mit 2,5 ng/ml TGFβ bzw. 7,5 ng/ml zu einer erhöhten Reduktion der Spaltbreite mit Werten von ca. 170% bzw. 120% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Zelllinien HCC44 und Calu-3 zeigen sowohl nach 24 Stunden als auch 48 Stunden unter Stimulation mit 2,5 ng/ml bzw. 7,5 ng/ml TGFβ einen erhöhten Wundverschluss. Das Ausmaß dieser Erhöhung variiert für die Zelllinie HCC44 mit der schnellsten Wundbreitenreduktion bei 7,5 ng/ml TGFβ nach 24 Stunden (165%) und einer geringeren bei 2,5 ng/ml TGFβ nach 24 Stunden (115%). Bei Calu-3 ist der höchste gemessene Wert nach 48 Stunden bei 2,5 ng/ml mit 180% zu finden, der niedrigste nach 24 Stunden unter 2,5 ng/ml TGFβ-Stimulation mit 125%.

Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten NSCLC-Zelllinien unterschiedlich auf TGFβ reagieren. Die gemessenen Werte differieren erheblich je nach Zeitdauer und Konzentration der TGFβ-Stimulation.

5 Diskussion

5.1 Die Cadherine in Lungentumorzelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Adenokarzinomzelllinien der Lunge analysiert. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei auf den E-Cadherin-Catenin-Komplex gelegt. Dieser Komplex besteht aus E-Cadherin, welches als transmembranäres Protein eine homophile Verbindung zu E-Cadherin-Molekülen benachbarter Zellen herstellt, und andererseits intrazellulär durch Bindung verschiedener Catenine mit dem zellulären Zytoskelett verbunden ist. Die im Komplex vorkommenden Catenine binden an zwei unterschiedliche Regionen des E-Cadherin-Moleküls: p120ctn bindet an die Juxta-Membran-Domäne und β -Catenin bzw. γ -Catenin an die Catenin-Bindungs-Domäne (Aghib und McCrea 1995, Anastasiadis und Reynolds 2000). β -Catenin bzw. γ -Catenin wiederum verbinden diesen Komplex mit α -Catenin, das seinerseits eine Verbindung mit dem Aktinzytoskelett herstellt (Desai et al. 2013).

In einer der ersten Schritte wurde der Cadheringehalt in den untersuchten Tumorzelllinien mittels Western Blot analysiert (Abbildung 4). Trotz der gemeinsamen Zugehörigkeit der untersuchten NSCLC-Zelllinien zur Untergruppe der Adenokarzinome, ist eine große Heterogenität im endogenen Gehalt von E-Cadherin nachweisbar. Auffällig sind hier einerseits die Zelllinien Calu-3 und H358 mit einem hohen Gehalt an E-Cadherin, andererseits H23 mit einem sehr geringen Gehalt an E-Cadherin.

Ursachen für den E-Cadherinverlust sind in der Literatur vielfältig beschrieben worden. So verweisen Hajra und Fearon (2002) beispielsweise auf Keimbahn- und somatische Mutationen von *CDH1*, dem Gen von E-Cadherin. Ebenso denkbar sind epigenetische Ursachen wie Hypermethylierung des Promotors von E-Cadherin. Einen großen Einfluss auf die E-Cadherin-Expression haben zudem die durch TGF β beeinflussten Transkriptionsfaktoren Snail1 und Snail2. Diese Transkriptionsfaktoren können die E-Cadherin-Expression supprimieren (Villarejo et al. 2014, Xu et al. 2009).

Im Rahmen der Progression von Tumorzellen kann es neben dem Verlust von E-Cadherin auch zum Hinzugewinn von anderen Cadherinen wie beispielsweise N-Cadherin kommen. Dieser Prozess wird als *Cadherin-Switch* bezeichnet. Insbesondere der Hinzugewinn von mesenchymalen N-Cadherin wird von verschiedenen Autoren als notwendig erachtet für eine gesteigerte Invasivität und eine mögliche Metastasierung von Karzinomen (Wheelock et al. 2008, Hajra und Fearon 2002, Cavallaro und Christofori 2004).

H23, eine Zelllinie mit sehr wenig E-Cadherin, zeigt einen deutlich erhöhten Gehalt von N-Cadherin. Zellen der Linie HCC44 bilden trotz geringer Mengen von E-Cadherin kein N-Cadherin. Die Zelllinie H358 zeigt hingegen große Mengen von E-Cadherin und N-Cadherin. Aus den Ergebnissen der untersuchten NSCLC-Zelllinien lässt sich schließen, dass der Verlust von E-Cadherin in NSCLC-Zelllinien nicht automatisch zu erhöhter Expression von N-Cadherin führt.

P-Cadherin, neben E-Cadherin ein weiteres epitheliales Cadherin, ist ebenfalls im Western Blot in den Zelllinien H358, Calu-3 und in geringem Maße in HCC44 nachweisbar (Abbildung 4). In der Zelllinien H23 ist P-Cadherin nicht detektierbar.

Der Einfluss der P-Cadherin-Expression ist in Lungentumoren bisher nicht beschrieben worden. In Tumoren der Mamma fördert P-Cadherin bei vorhandenem E-Cadherin die Invasivität. Es zeigt sich dort eine Kolo-kalisation von E- und P-Cadherin. Die Kolo-kalisation kann ein Hinweis für eine konkurrierende Bindung der Catenine sein, die zu einer Abschwächung der starken E-Cadherin-vermittelten Adhäsion führen könnte (Ribeiro et al. 2013). Im Pankreasadenokarzinom konnte zudem eine Erhöhung der Mobilität der Zellen durch überexprimiertes P-Cadherin nachgewiesen werden. Die Überexpression ging dort einher mit einer Akkumulation von p120ctn im Zytosol und einer Aktivierung der GTPasen Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) und Cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*) (Taniuchi et al. 2005).

Ob in den untersuchten Adenokarzinomzelllinien der Lunge eine solche Kolo-kalisation von E- und P-Cadherin vorhanden ist oder ob es zu einer Aktivierung von Rac1 und Cdc42 kommt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es ließen sich lediglich lamellipodienähnliche Strukturen (Abbildung 9) nachweisen, die möglicherweise auf eine Aktivierung von Rac1 und Cdc42 zurückzuführen sein könnten. Diese Strukturen zeigten sich in H358-Zellen bei vorhandenem P-Cadherin. In Calu-3-Zellen hingegen waren trotz nachweisbaren P-Cadherin keine lamellipodienähnliche Strukturen detektierbar. Daher erscheint eine Korrelation zwischen P-Cadherin und den genannten Strukturen in Lungentumorzelllinien nicht vorzuliegen.

Cadherin-11 ist lediglich mit einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa im Western Blot nachweisbar und nicht mit der zu erwartenden Größe von 120 kDa (McCusker et al. 2009). Vermutet werden kann, dass es sich bei dem nachgewiesenen Cadherin-11-Protein um ein nicht vollständig im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat modifiziertes Vorläuferprotein handelt. Des Weiteren ist denkbar, dass es sich um die von Kawaguchi et al. (1999) beschriebene verkürzte Cadherin-11-Isoform handelt, die ca. 85 kDa aufweist und im Lungengewebe vorkommt. Dieser verkürzten Isoform kommen laut Kawaguchi et al. (1999) keine direkten Adhäsionseigenschaften zu, sondern es wird

vermutet, dass sie die vollständige Isoform von Cadherin-11 in ihrer Adhäsion stärkt. McCusker et al. (2009) haben zudem ein ca. 80 kDa schweres Spaltprodukt von Cadherin-11 in ihren Untersuchungen nachweisen können, sodass auch nicht auszuschließen ist, dass auch dieses Abbauprodukt hier nachgewiesen wurde. Aufgrund dieser Unklarheiten sollten gezielte Untersuchungen zur Rolle von Cadherin-11 in Lungentumorzelllinien erfolgen.

5.2 Die Catenine in Lungentumorzelllinien

Alle untersuchten Tumorzelllinien zeigen im Western Blot, die im E-Cadherin-Catenin-Komplex beschriebenen Catenine (Abbildung 5). Die nachgewiesene Menge von α -Catenin korreliert mit der detektierten Menge von E-Cadherin, sodass zu vermuten ist, dass E-Cadherin das mengenmäßig wichtigste Cadherin ist, welches über α -Catenin eine Assoziation an das Zytoskelett eingeht. Diese Assoziation wird als entscheidend angesehen für eine starke Zell-Zell-Adhäsion (Desai et al. 2013).

Der endogene Gehalt von β - und γ -Catenin variiert deutlich zwischen den untersuchten Zelllinien. Es lässt sich zudem keine Korrelation zwischen den Konzentrationen des vorhandenen E-Cadherin und des vorhandenen β - bzw. γ -Catenins nachweisen. HCC44-Zellen zeigen wenig E-Cadherin und dennoch viel γ -Catenin. Calu-3 hingegen zeigt viel E-Cadherin und γ -Catenin. β -Catenin ist in H358-Zellen im erhöhten Maß nachweisbar, in Calu-3 dagegen nur geringgradig.

Die fehlende Korrelation des Gehaltes von β -Catenin bzw. γ -Catenin mit E-Cadherin verdeutlicht, dass die Funktion der Catenine in den untersuchten Lungentumorzelllinien nicht nur auf den Aufbau des E-Cadherin-Catenin-Komplexes beschränkt sein kann.

β -Catenin könnte in den untersuchten Lungentumorzelllinien auch in den Wnt-Signalweg eingebunden sein und z.B. durch Kooperation mit TCF/Lef (*transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor*) die Transkription verschiedener Gene beeinflussen (Jeanes et al. 2008). Xi und Chen (2014) beschreiben den Einfluss des Wnt-Signalwegs in Lungentumoren. Durch die Aktivierung dieses Signalweges kann es in Lungentumoren zur zytoplasmatischen und nukleären Akkumulation von β -Catenin kommen und unter der beschriebenen Kooperation mit TCF/Lef zur Transkription von beispielsweise Cyclin D1 oder Myc (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*). Zudem wird von Xi und Chen (2014) ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Wnt und Knochenmetastasen in NSCLC vermutet. Aktary und Pasdar (2012) weisen zudem darauf hin, dass β -Catenin möglicherweise von γ -Catenin aus den *Adherens Junctions* verdrängt werden könnte und in der Folge β -Catenin den Wnt-Signalweg aktivieren kann. Ob dieser Mechanismus auch für die untersuchten Lungentumorzelllinien in Frage kommt, bleibt

offen. Der teilweise sehr hohe Gehalt von γ -Catenin kann zudem auf einen hohen Gehalt von Desmosomen hinweisen, in denen γ -Catenin im Gegensatz zu β -Catenin eine weitere zelluläre Funktion hat (Zhurinsky et al. 2000). Diese Haftstrukturen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht analysiert.

P120ctn kann mit verschiedenen Proteinmassen in unterschiedlichster Expression in den untersuchten Adenokarzinomzelllinien gefunden werden. H23-Zellen zeigen den geringsten endogenen Gehalt von p120ctn, H358 und Calu-3-Zellen hingegen den höchsten Gehalt. In der Zelllinie H23 sind zudem nur p120ctn-Moleküle mit ca. 110 kDa nachweisbar. Diese nachgewiesenen Proteine könnten den Isoformen 1 oder 2 von p120ctn entsprechen. In Calu-3 und H358-Zellen findet sich hingegen ein Molekül mit ca. 95 kDa, welches der Isoform 3 entsprechen könnte. Eine genaue Zuordnung der detektierten Proteine wäre z.B. durch den Vergleich mit exogen eingebrachten Isoformen oder durch Verwendung von isoformspezifischen Antikörpern möglich. Der isoformspezifische Nachweis von p120ctn würde eine genauere Analyse von Lungentumorzelllinien ermöglichen.

In NSCLC wurde gezeigt, dass die Isoform 1 verstärkt im Zytoplasma zu finden ist, wohingegen sie in normalem Lungengewebe kaum nachweisbar ist (Miao et al. 2010). In den Zelllinien H358, HCC44 und Calu-3 ist die möglicherweise als Isoform 1 oder 2 anzusehende Form von p120ctn im Western Blot nachweisbar. Die Lokalisation dieser Isoform in den untersuchten Zellen lässt sich allerdings nur vermuten. Eine Bindung an E-Cadherin kann zwar in der Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden (Abbildung 10), denkbar bleibt allerdings eine Bindung an beispielsweise N-Cadherin, wie sie in Pankreaskarzinomzelllinien nachgewiesen werden konnte (Seidel et al. 2004).

Seidel et al. (2004) konnten zudem zeigen, dass E-Cadherin in Pankreaskarzinomzelllinien verstärkt mit der Isoform 3, also möglicherweise mit der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Isoform bei 95 kDa, assoziiert ist. In Pankreastumorzelllinien kommen verschiedenen p120ctn-Isoformen eine unterschiedliche Lokalisation und Funktion zu. Liu et al. (2009) zeigten, dass auch in Lungentumorzelllinien das Zellverhalten durch unterschiedliche p120ctn-Isoformen differenziert moduliert wird. Durch Überexpression von p120ctn1A in A549-Zellen wurde in deren Versuchen die Invasivität der Zelllinie verringert und der Gehalt von E-Cadherin und β -Catenin erhöht. Die Überexpression von p120ctn3A reduzierte dagegen die Proliferation. Die Ergebnisse von Liu et al. (2009) lassen sich allerdings nicht ohne weiteres auf weitere Lungentumorzelllinien übertragen. Die Analyse des p120ctn-Proteingehalts, der in dieser Arbeit untersuchten Lungenadenokarzinomzelllinien, zeigt eine große Heterogenität. Zudem sind die analysierten A549-Zellen in der Arbeit von Liu et al. (2009) frei von

endogenen p120ctn, welches sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen lässt. Möglicherweise war die Sensitivität der von Liu et al. (2009) gewählten Nachweismethoden nicht hoch genug, um endogenes p120ctn nachzuweisen.

Das Zellverhalten ist zudem durch Phosphorylierung von p120ctn beeinflussbar. So beeinflusst die unterschiedliche Phosphorylierung durch die zellulären Kinasen Src oder Fyn die Bindung von p120ctn an RhoA und damit die Bildung von Stressfasern (Castano et al. 2007).

Die vorliegenden Ergebnisse (Abbildung 6) zeigen, dass die Gruppe der Adenokarzinomzelllinien der Lunge unterschiedliche Phosphorylierungen an p120ctn aufweist. Genauere Analysen der Phosphorylierung von p120ctn erscheinen daher ratsam, um die Funktion von p120ctn in Lungentumorzelllinien zu bestimmen (eine Übersicht zum Einfluss von p120ctn in Tumorzellen findet sich in der Arbeit von Schackmann et al. (2013)).

5.3 Der E-Cadherin-Catenin-Komplex in Lungentumorzelllinien

In allen untersuchten Lungentumorzelllinien finden sich die oben bzw. in der Einleitung beschriebenen Bestandteile des E-Cadherin-Catenin-Komplexes. Das Vorhandensein der Bestandteile dieses Komplexes wirft die Frage auf, wo sich diese Bestandteile in der Zelle befinden und ob diese Proteine einen Komplex bilden. Zu diesem Zwecke wurde die Lokalisation von E-Cadherin, p120ctn und α -Catenin mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt. Dieses Verfahren sollte im ersten Schritt auf Kollokalisierungen der genannten Proteine hinweisen. Eine Kollokalisierung kann erste Hinweise auf das Vorhandensein eines Komplexes geben.

In den Zelllinien H358, H23 und Calu-3 kann sowohl im konfluenten, also bei vollständiger Ausbreitung im Wachstumsgefäß, als auch im subkonfluenten Zustand der Zellen, eine Kollokalisierung von E-Cadherin und α -Catenin bzw. p120ctn nachgewiesen werden (Abbildung 7 und 8). In HCC44-Zellen ist diese Kollokalisierung hingegen lediglich im konfluenten Zustand nachweisbar.

Im konfluenten Zustand bewirken Zell-Zell-Kontakte eine Kontaktinhibition, einen Vorgang, der die Zellteilung inhibiert. E-Cadherin ist in diesem Prozess involviert (Abercrombie 1979, McLachlan und Yap 2007) Möglicherweise wird in HCC44-Zellen der E-Cadherin-Catenin-Komplex erst im Rahmen dieser Kontaktinhibition gebildet.

In Untersuchungen zum E-Cadherin-Catenin-Komplex in Lungentumoren wurden Bestandteile des Komplexes in der überwiegenden Zahl der Fälle ebenfalls mikroskopisch, mittels Immunhistochemie, analysiert. So verglichen Smythe et al. (1999) physiologisches Bronchialgewebe mit Tumoren der Lunge in Bezug auf ihren Gehalt von E- und P-Cadherin sowie γ - und α -Catenin. Kim et al. (2013) haben die

Immunhistochemie zur Untersuchung von β -Catenin und E-Cadherin in Adenokarzinomen angewandt, Zhang et al. (2013) zur Analyse in Plattenepithelkarzinomen der Lunge. Yoo et al. (2012) zeigten mittels Immunhistochemie, dass ein niedriger Gehalt von E-Cadherin mit einer erhöhten Anzahl an ZNS-Metastasen korreliert. Yang et al. (2014) beschränkten sich in einer Metaanalyse mit 29 Studien und über 4000 Patienten ebenfalls auf Untersuchungen mittels Immunhistochemie. Miao et al. (2010) verglichen mittels Immunhistochemie die Expression von p120ctn in Lungengewebe gesunder Probanden mit Gewebe aus Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und Metastasen der Lunge. Zhang et al. (2014b) untersuchten mit Hilfe von Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verschiedene Zelllinien der Lunge auf E-Cadherin und p120ctn.

Die überwiegende Anzahl dieser und weiterer Untersuchungen zeigen, dass eine verringerte Expression von E-Cadherin und Cateninen in Tumoren der Lunge zu finden ist und mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einer erhöhten Zahl an Metastasen und einer schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten verbunden ist.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Immunkopräzipitation, dass sowohl α -, β - als auch γ -Catenin im Komplex mit E-Cadherin vorhanden sind, allerdings in unterschiedlichster Menge. P120ctn ist in H23-Zellen trotz Kolo-kalisation mit E-Cadherin in der Immunfluoreszenz nicht durch die Immunkopräzipitation im Komplex nachweisbar.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein mikroskopischer Nachweis der Bestandteile des E-Cadherin-Catenin-Komplexes unzureichend ist, um auf das Vorhandensein eines E-Cadherin-Catenin-Komplexes zu schließen, welcher eine starke Zell-Zell-Adhäsion vermittelt.

Der alleinige Nachweis mittels Immunhistochemie unterschätzt möglicherweise die Veränderungen des E-Cadherin-Catenin-Komplexes in Lungentumoren. Denkbar ist, dass viele Tumore, die diese Bestandteile immunhistochemisch zeigen, bereits Alterationen im Komplex haben und daher der Komplex in Funktion für die Zell-Zell-Adhäsion bereits eingeschränkt ist. Nicht auszuschließen bleibt allerdings, dass die Verbindung von E-Cadherin mit p120ctn in H23-Zellen zu schwach ist, um in der Immunpräzipitation detektiert zu werden. Anastasiadis und Reynolds (2000) weisen in ihrer Übersichtsarbeit auf das schwache Bindungsverhalten von p120ctn an E-Cadherin in detergenzienhaltigen Zelllysaten hin. Zudem lässt sich trotz Verwendung von 500 μ g Lysat für die Immunpräzipitation nur eine Anreicherung von E-Cadherin auf ein Maß wie im Western Blot mit 50 μ g Zelllysaten erzielen (Abbildung 10). Dies deutet daraufhin, dass die verwendete Anzahl an Waschschritten (Material und Methoden) zu hoch ist, um eine möglicherweise sehr schwachen Bindungen aufzudecken. Weitere Modifikationen der

Immunpräzipitation scheinen daher notwendig bevor die Assoziation von p120ctn an E-Cadherin in der Zelllinie H23 ausgeschlossen werden kann.

Neben den Cateninen sind weitere Moleküle als Bestandteile des E-Cadherin-Catenin-Komplexes beschrieben worden. In diversen Zelllinien konnten verschiedene membranäre Wachstumsfaktorrezeptoren wie FGFR1 (El-Hariry et al. 2001), EGFR (Qian et al. 2004, Hoschuetzky et al. 1994) und IGFR1 β (Qian et al. 2004) im Komplex mit E-Cadherin nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit kann sowohl IGFR1 β als auch EGFR im Gesamtlisat der Zelllinien H358, H23, HCC44 und Calu-3 nachgewiesen werden (Abbildung 12). Aufgrund von divergierenden Ergebnissen bei der Verwendung verschiedener anti-FGFR-Antikörper ist ein sicherer Nachweis von FGFR1 nicht möglich gewesen.

In Calu-3-Zellen zeigt sich eine erhöhte Expression von EGFR mit einem erhöhten Molekulargewicht (Abbildung 12). Der Nachweis dieses Proteins kann möglicherweise auf eine verstärkte Phosphorylierung des Rezeptors und damit eine höhere Aktivität von EGFR hinweisen. Vereinbar mit dieser Hypothese ist der Nachweis der Phosphorylierung von p120ctn an Y228 und Y291 (Abbildung 6), welche durch aktivierten EGFR möglich ist (Marnier et al. 2003, MacPherson et al. 2007, Hong et al. 2016). Kourtidis et al. (2015) konnten nachweisen, dass eine Phosphorylierung von Y228 verstärkt in Brust- und Nierentumorzelllinien zu finden ist im Vergleich zu normalen Geweben. Weitere Analysen müssen zeigen, ob sich diese Phosphorylierung auch verstärkt in anderen Lungentumorzelllinien findet und ob diese Phosphorylierung von EGFR abhängig ist.

Der verwendete Antikörper zu Detektion von EGFR (Santa Cruz Biotechnology [Dallas, USA], #sc-03) dient zur Detektion von EGFR1. Der Hersteller schließt allerdings nicht aus, dass auch überexprimierter EGFR2 detektiert wird (Santa Cruz Biotechnology 2015). Cha et al. (2012) weisen darauf hin, dass der EGFR2 in Calu-3 amplifiziert ist. Daher ist nicht auszuschließen, dass der positive EGFR1 Nachweis in Calu-3 auf überexprimierten EGFR2 zurückzuführen ist.

In den vier analysierten Zelllinien kann mit Hilfe der Immunkopräzipitation keine Assoziation von IGFR1 β und EGFR mit E-Cadherin nachgewiesen werden (Abbildung 13). Auch nach Stimulation mit EGF und IGF ist in der Zelllinie Calu-3 kein Komplex nachweisbar. El-Hariry et al. (2001) untersuchten die Assoziation von FGFR1 und E-Cadherin in der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC3, Qian et al. (2004) IGFR1 β und EGFR in der Epithelzelllinie MDCK. Es konnten dort jeweils die genannten Rezeptoren im Komplex mit E-Cadherin nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse weisen auf eine zelltypspezifische Regulation der Assoziation der Rezeptortyrosinkinasen mit E-Cadherin hin.

5.4 p190-Rho-GAP in Lungentumorzelllinien

Die E-Cadherin-Catenin-Komplexbildung an der Zellmembran bewirkt einen Umbau des Aktinzytoskeletts. Die Assoziation von p190-Rho-GAP an den E-Cadherin-Komplex stellt eine Möglichkeit der Regulierung von RhoA, einem Modulator des Aktinzytoskeletts, im Rahmen dieser Komplexbildung dar (Menke und Giehl 2012, Harris und Tepass 2010). Daher wurde in dieser Arbeit p190-Rho-GAP analysiert.

Wildenberg et al. (2006) beschreiben, dass in NIH3T3-Fibroblasten p190-Rho-GAP über p120ctn indirekt an N-Cadherin bindet. p190-Rho-GAP ist in deren Arbeit in der Immunpräzipitation von p120ctn nachweisbar, allerdings nicht in der Immunpräzipitation von N-Cadherin oder β -Catenin. Molina-Ortiz et al. (2009) zeigten zudem, dass p190-Rho-GAP direkt p120ctn bindet. Die Lokalisation von p190-Rho-GAP wird von Molina-Ortiz et al. (2009) als vom E-Cadherin-Gehalt abhängig beschrieben. Eine verstärkte E-Cadherin-Expression führt zur verstärkten p190-Rho-GAP-Lokalisation in Membranvorstülpungen. Sie vermuten daher, dass p120ctn gleichzeitig E-Cadherin und p190-Rho-GAP bindet. Asnaghi et al. (2010) zeigten zudem für die Lungentumorzelllinie H1299, dass der Gehalt von E-Cadherin die Aktivität von RhoA beeinflusst. Eine Erhöhung der E-Cadherin-Expression bewirkte eine Hemmung von RhoA bei gleichzeitiger verstärkter Kolo-kalisation von p190-Rho-GAP und RhoA in der Zellmembran.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zeigen einen ähnlichen Gehalt von p190-Rho-GAP im Western Blot (Abbildung 12). Im Komplex mit E-Cadherin kann p190-Rho-GAP nur in den Zelllinien H358 und HCC44 nachgewiesen werden (Abbildung 13). P120ctn lässt sich im Komplex mit E-Cadherin in der Zelllinie H358 nachweisen, jedoch nicht in der Zelllinie HCC44 (Abbildung 10).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass p190-Rho-GAP nur in wenigen Adenokarzinomzelllinien der Lunge im Komplex mit E-Cadherin nachgewiesen werden kann. Die von Molina-Ortiz et al. (2009) beschriebene indirekte Assoziation von p190-Rho-GAP mit E-Cadherin über p120ctn ist in H358-Zellen denkbar. In HCC44-Zellen ist aufgrund des Fehlens von p120ctn im E-Cadherin-Catenin-Komplex dagegen von einer direkten Assoziation von p190-Rho-GAP an E-Cadherin oder einer indirekten Bindung über andere Proteine als p120ctn auszugehen. Eine Übersicht weiterer möglicher Bindungspartner von p190-RhoGAP ist in der Arbeit von Kshitiz et al. (2014) zu finden. Genauere Analysen von p190-Rho-GAP in Bezug auf das Bindungsverhalten, den Einfluss auf die Rho-Proteine und die Analyse der Lokalisation dieses Proteins, sind notwendig, um die Funktion dieses Proteins in Lungenadenokarzinomzelllinien zu verstehen.

5.5 Assoziation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Zytoskelett

Neben dem Vorhandensein der Catenine im Komplex mit E-Cadherin, wird die Verbindung mit dem Zytoskelett als notwendig angesehen, um eine starke Zell-Zell-Adhäsion zu ermöglichen (Desai et al. 2013). Durch die Verbindung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Aktinzytoskelett können mechanische Kräfte auf die Zelle übertragen werden (Buckley et al. 2014) und der Aufbau der *Adherens Junctions* reguliert werden (Mège et al. 2006, Harris und Tepass 2010). Die Assoziation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Aktinzytoskelett ermöglicht zudem die Steuerung der Lokalisation von E-Cadherin in der Membran. Dieser Prozess verstärkt die Zell-Zell-Adhäsion, indem es zur Akkumulation von Cadherinen an einem Punkt kommt (Nelson 2008). Eine Möglichkeit zum Nachweis der Assoziation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Zytoskelett besteht in der Zellfraktionierung mittels Triton X-100. Durch diese Technik werden die Membranen aufgelöst und Proteine der Zelle in zwei Fraktionen aufgeteilt. In der tritonunlöslichen Fraktion finden sich Proteine mit Assoziation zum Zytoskelett, wohingegen sich in der tritonlöslichen Fraktion Proteine ohne Verbindung zum Zytoskelett finden.

H358-Zellen zeigen einen hohen Gehalt an E-Cadherin in der tritonunlöslichen Fraktion. In H23-Zellen hingegen lässt sich E-Cadherin mehrheitlich in der tritonlöslichen Fraktion detektieren. Die Zelllinie Calu-3 wiederum zeigt einen ähnlichen Gehalt von E-Cadherin in beiden Fraktionen.

Die vorliegenden Ergebnisse (Abbildung 11) zeigen, dass aus der durch Immunfluoreszenz ermittelten Lokalisation von E-Cadherin und den Cateninen in der Membran und der Darstellung des Komplexes mittels Immunpräzipitation nicht geschlossen werden kann, dass der E-Cadherin-Catenin-Komplex an das Zytoskelett assoziiert ist. Eine fehlende Assoziation des Komplexes mit dem Aktinzytoskelett, z.B. bei fehlenden oder mutierten α -Catenin (Thomas et al. 2013) oder fehlender intrazellulärer Cateninbindungsfähigkeit von E-Cadherin (Nagafuchi und Takeichi 1988) reduziert die Adhäsionsstärke der Zelle. Die nicht nachweisbare Assoziation von E-Cadherin an das Aktinzytoskelett in H23-Zellen legt nahe, dass der dort nachgewiesene Komplex in seiner Adhäsionsfunktion nur eingeschränkt zur Verfügung steht. Eine Möglichkeit die Bedeutung der auf den Cadherinen basierenden Adhäsion zu messen, besteht in der Durchführung von Aggregationsassays und des Vergleichs der gemessenen Werte in calciumhaltigem und calciumfreiem Medium. Eine große Differenz der Werte im calciumhaltigen Medium im Vergleich zum Calciumentzug durch EDTA deutet auf einen hohen Anteil der Cadherine an der Gesamttaggregation hin. In der Zelllinie H23 zeigt sich nur eine geringe Differenz der erhaltenen Werte (Abbildung 15).

Es lässt sich daher schließen, dass der E-Cadherin-Catenin-Komplex in H23-Zellen im Hinblick auf die Aggregation zu vernachlässigen ist. Da sich in der Tritonfraktionierung große Mengen von γ -Catenin, in der tritonunlöslichen Fraktion fanden, erscheint es ratsam in weiteren Untersuchungen zu dieser Zelllinie die Bedeutung von desmosomalen Adhäsionsstrukturen zu analysieren. In diesen Adhäsionsstrukturen ist γ -Catenin als Bindeglied zum Intermediärfilamentsystem vorhanden (Zhurinsky et al. 2000). Desmosomale Haftstrukturen sind jedoch durch die in ihnen vorhandenen desmosomalen Cadherine ebenfalls von Calcium abhängig. Die geringe Differenz der Werte im Aggregationsassay gibt daher bereits einen ersten Hinweis darauf, dass die desmosomalen Adhäsionsstrukturen ebenfalls eine geringe Rolle in der Regulation der Aggregation bzw. Adhäsion dieser Zelllinie haben könnten.

5.6 Auswirkungen von TGF β auf die Migration von Lungentumorzelllinien

TGF β beeinflusst auf vielfache Weise das Verhalten von Tumorzellen. Insbesondere die Lungentumorzelllinie A549 wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eingehend untersucht. Eine Stimulation mit TGF β induziert in dieser Zelllinie eine Veränderung des Phänotyps. Es entsteht ein fibroblastenähnlicher, elongierter Zellkörper. Zeitgleich kommt es zum Verlust von E-Cadherin. Im Migrationsassay kann zudem eine Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit gemessen werden, z.B. nach einer Stimulation mit 1 ng/ml (Saito et al. 2009) oder 2 ng/ml TGF β (Tirino et al. 2013). Die Migrationsgeschwindigkeit und die Cadherinexpression wird in A549-Zellen TGF β -abhängig über die Transkriptionsfaktoren Snail1 und Snail2 reguliert (Saito et al. 2009, Tirino et al. 2013). Diese Transkriptionsfaktoren werden durch die SMAD-Proteine aktiviert (Einleitung).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vier Tumorzelllinien der Lunge untersucht und der Effekt einer Stimulation durch TGF β mit einer Konzentration von 2,5 ng/ml und 7,5 ng/ml analysiert. Für einen Teil dieser Zelllinien wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen bereits gezeigt, dass sie auf TGF β -Stimulation reagieren. Nguyen et al. (2014) konnten in den Zelllinien Calu-3 und H23 eine Aktivierung von SMAD2 unter TGF β -Stimulation nachweisen. Datta et al. (2013) zeigten diese Aktivierung von SMAD2 für die Zelllinie H358 und A549.

Die Untersuchung der Lungenkarzinomzelllinien ergibt teilweise einen verlangsamten Wundverschluss unter TGF β -Stimulation (H358 nach 24 und 48 Stunden und H23 nach 24 Stunden), zum Teil kommt es auch zu einer schnelleren Reduktion der Spaltbreite, was mit einer erhöhten Migration gleichzusetzen ist (HCC44, Calu-3 jeweils nach 24 und 48 Stunden und H23 nach 48 Stunden). Das unterschiedlich schnelle Ansprechen der untersuchten Zelllinien in den Migrationsversuchen kann auf die Beeinflussung

verschiedener Zielstrukturen bzw. Signalproteine hinweisen, wie z.B. ERK oder N-Cadherin in den entsprechenden Zelllinien (Zhang 2009, Xu et al. 2009, Pickup et al. 2013, Yang et al. 2015).

Das Signalmolekül ERK bewirkt eine Induktion der EMT und moduliert die Invasivität und Motilität von Zellen. Zhang et al. (2014a) zeigten, dass bei Stimulation mit niedrigen Dosen TGF β (0,1 ng/ml) ERK aktiviert wird, bei hohen Dosen (10 ng/ml) hingegen wurde die ERK-Aktivität supprimiert. Als einen Regulator dieses Effektes beschreiben Principe et al. (2014) und Zhang et al. (2014a) die Protein-Phosphatase 2A. Eine Analyse dieses Moleküls und des ERK-Signalweges in den hier untersuchten Zellen könnte Hinweise auf die molekularen Mechanismen der hier beschriebenen TGF β -Effekte in den Migrationsversuchen geben.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde unter TGF β -Stimulation neben der Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit eine Veränderung der Cadherinexpression nachgewiesen. E-Cadherin wird reduziert, N-Cadherin dagegen verstärkt gebildet (Deng et al. 2014, Saito et al. 2009, Tirino et al. 2013). Maeda et al. (2005) beschreiben zudem, dass die erhöhte N-Cadherin-Expression ausschlaggebend ist für die schnellere Reduktion der Spaltbreite im Wundheilungsassay von Brustepithelzellen nach TGF β -Stimulation. In unterschiedlichen Zellsystemen wurde eine Modulation der N-Cadherin-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen. So konnten Maeda et al. (2005) eine verstärkte Expression von N-Cadherin in Brustepithelien bereits nach 12 Stunden nachweisen, Nuessle et al. (2011) in glatten Muskelzellen ebenfalls nach 12 Stunden, jedoch mit einem Maximum nach 24 Stunden. Yang et al. (2015) zeigten in der Lungentumorzelllinie A549 eine erhöhte Expression von N-Cadherin nach 24 Stunden unter Stimulation mit 5 ng/ml TGF β . In der Zelllinie H358 dagegen, ist diese Erhöhung der N-Cadherin-Expression erst nach drei Tagen kontinuierlicher TGF β -Stimulation nachweisbar (Nasarre et al. 2013). Der Beobachtungszeitraum von 48 Stunden erscheint daher zu kurz, um eine Erhöhung der Migration von H358-Zellen zu messen. Zudem verwendeten Nasarre et al. (2013) in deren Versuchen Konzentrationen von 10 ng/ml TGF β und nicht wie in der vorliegenden Arbeit 2,5 bzw. 7,5 ng/ml. Die Suppression der Migration im Zeitraum bis 48 Stunden könnte durch die erwähnte und von Principe et al. (2014) bzw. Zhang et al. (2014a) beschriebene Regulation der ERK-Aktivität erklärbar sein. Für die vorliegenden Versuche kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Zelllinien bereits durch autokrine Stimulation mit TGF β in ihrem Verhalten beeinflusst sind, wie es Vázquez et al. (2013) in ihren Versuchen zeigten. Diese autokrine Stimulation erschwert eine genauere Analyse des TGF β -Einflusses in den untersuchten Tumorzelllinien.

5.7 Ausblick

Die epithelial-mesenchymale Transition wird als ein Schlüsselprozess der Tumorprogression beschrieben. Im Rahmen dieses Prozesses kommt es zu Alterationen des E-Cadherin-Catenin-Komplexes. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der E-Cadherin-Catenin-Komplex in Adenokarzinomzelllinien der Lunge zahlreiche Veränderungen, wie Verlust von p120ctn oder fehlende Assoziation zum Zytoskelett aufweist. Die Ergebnisse der Adhäsionsuntersuchungen zeigen zudem, dass der E-Cadherin-Catenin-Komplex in den untersuchten Zellen nur noch eine geringe Adhäsionsfunktion aufweist. Weitere Experimente müssen zeigen, welche Funktionen N-, P-Cadherin oder Cadherin-11 in dieser Tumorentität erfüllen.

Das Signalmolekül TGF β wurde von zahlreichen Autoren als ein Hauptmediator für die epithelial-mesenchymale Transition beschrieben. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich die Frage des Einflusses von TGF β auf Adenokarzinomzelllinien der Lunge nicht pauschal beantworten lässt. Eine genauere Analyse der Wirkweise von TGF β unter Berücksichtigung der verschiedenen Signalwege wie z.B. der MAPK-Signalwege und der Transkriptionsfaktoren Snail1 und Snail2 erscheint daher notwendig.

Zudem zeigt sich, dass die Betrachtung der einzelnen Zelllinien als zur morphologischen Gruppe der Adenokarzinome zugehörig, nur unzureichend geeignet ist, um das Migrations- und Adhäsionsverhalten vorherzusagen. Eine Zuordnung anhand von Leitmutationen, aktivierten Signalwegen und Expression von Adhäsionsproteinen scheint einer Klassifikation der Tumoren der Lunge gerechter zu werden als eine Zuordnung anhand morphologischer Kriterien.

6 Zusammenfassung

Der E-Cadherin-Adhäsionskomplex stellt eine Schlüsselstruktur für die Aufrechterhaltung der Integrität epithelialer Gewebe dar. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass sich in malignen Tumoren im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition die E-Cadherin-Konzentration verringert und es zur Expression verschiedener anderer Cadherine kommt. Ziel dieser Arbeit war es, den E-Cadherin-Adhäsionskomplex in Lungentumorzelllinien zu beschreiben, eventuelle Veränderungen aufzuzeigen und den Einfluss von TGF β , einem Induktor der epithelial-mesenchymalen Transition, auf Migration und Aggregation zu untersuchen.

Es wurden die Zelllinien A549, H23, H358, HCC44, Calu-3 und Colo699 analysiert. Die Gruppe der Adenokarzinomzelllinien der Lunge stellte sich als äußerst heterogen in ihrer Cadherin- und Catenin-Expression dar. In einzelnen Zelllinien konnte eine Reduktion der E-Cadherin-Expression gefunden werden. Zudem kam es zur Neubildung weiterer Cadherine wie N-Cadherin oder P-Cadherin. Die Catenine, als Teil des Adhäsionskomplexes, waren in allen untersuchten Zelllinien im Western Blot nachweisbar. Die Menge dieser Proteine stellte sich als sehr variabel dar. Die Menge vorhandenen α -Catenins korrelierte mit der Menge von E-Cadherin.

Es konnte des Weiteren festgestellt werden, dass die Tumorzelllinien H358, HCC44 und Calu-3 γ -Catenin und auch β -Catenin in den Adhäsionskomplex einbauen. β -Catenin war zudem im Adhäsionskomplex der Zelllinie H23 nachweisbar. Die Zelllinien A549 und Colo699 wurden nicht weiter analysiert.

Die Immunfluoreszenz erwies sich, trotz oftmaliger Verwendung in der Literatur, als ein unzureichendes Verfahren, um den E-Cadherin-Adhäsionskomplex zu beschreiben. Mittels dieses Verfahrens ließ sich in den Zelllinien H358, H23, HCC44 und Calu-3 das Vorhandensein des E-Cadherin-Catenin-Komplexes vermuten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationen zeigten, dass α - und β -Catenin in den Komplex eingebaut werden. Die Tritonfraktionierungen belegten jedoch, dass der aufgezeigte E-Cadherin-Catenin-Komplex in der Zelllinie H23 nicht mit dem Zytoskelett assoziiert ist. Dieser Befund steht im Einklang mit den durchgeführten Aggregationsversuchen, in denen nachgewiesen werden konnte, dass der E-Cadherin-Catenin-Komplex nur einen geringen Beitrag zur interzellulären Adhäsion der analysierten H23 Zellen leistet.

Der Einfluss von TGF β auf die Migration war abhängig von Stimulationsdauer, gewählter Konzentration und untersuchter Zelllinie. Die Migration von H23, HCC44 und Calu-3 Zellen wurde teilweise nach 24, spätestens nach 48 Stunden erhöht. H358 Zellen zeigten dagegen eine verringerte Migrationsgeschwindigkeit zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Weitere Analysen müssen zeigen, welche molekularen Mechanismen diese Unterschiede bedingen.

7 Summary

The E-cadherin adhesion complex is a key structure in the maintenance of epithelial tissue integrity. Many analyses show in malignant tumors a reduced presence of E-cadherin and high expression of other cadherins. The aim of this study was to describe the E-Cadherin adhesion complex in lung tumor cell lines, possible alterations of the complex and the influence of TGF β , an inducer of the epithelial mesenchymal transition, on the cell migration and aggregation.

The cell lines A549, H23, H358, HCC44, Calu-3 and Colo699 were analysed. The lung adenocarcinoma cell lines were very heterogeneous in their cadherin and catenin expression. In a few cell lines there was a low E-Cadherin amount. In most cell lines detection of other cadherins has been shown such as N- or P-Cadherin. The catenins, which are an essential part of the adhesion complex, were detectable in all cell lines. The amount of these proteins was very variable. The expression of α -catenin correlated with the expression of E-cadherin. α - and β - catenin were detectable in the adhesion complex of the tumor cell lines H358, HCC44, H23 and Calu-3. Furthermore γ -catenin, which can replace β -catenin in the adhesion complex, was identified in the complex of H358, HCC44 and Calu-3 cells. The cell lines A549 and Colo699 were not analysed further.

The immunofluorescence was, despite repeated use in literature, an inadequate technique to describe the E-cadherin adhesion complex. Identification of the single proteins and even its colocalization does not necessarily prove a direct interaction between the proteins. Immunohistochemistry identified E-Cadherin and α -catenin in H358, H23, HCC44 and Calu-3 cells. Immunoprecipitation studies pointed to the existence of an E-cadherin- β -catenin- α -catenin complex in this lung adenocarcinoma cell lines. Triton fractionation shows that the adhesion complex was not associated with the cytoskeleton in H23 cells. In agreement with these results, the aggregation assays show that the E-cadherin catenin complex contributes only to a small extent to cell-cell adhesion of the analysed H23 cells.

The growth factor TGF β increased the migration of H23, HCC44 and Calu-3 cells to different extents with respect to TGF β concentration and analysed cell lines. Compared with that, the migration of H358 was reduced in the analysed period of stimulation. Further experiments have to demonstrate the molecular mechanism behind this fact.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Axin	<i>axis inhibition protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
c-Src	<i>cellular sarcoma</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CDH1	Cadherin-1, Gen von E-Cadherin
CMF	Calcium-Magnesium-frei
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EC	Extrazelluläre Domäne
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSK3 β	Glykogensynthasekinase-3- β
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGFR	<i>insulin-like growth factor receptor</i>

IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Lef	<i>lymphoid enhancer-binding factor</i>
M/V	Masse pro Volumen
Myc	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NP40	<i>Nonidet P40</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
p120ctn	p120-Catenin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rho	<i>Ras homologue</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TCF	<i>transcription factor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
VH1	Vinculin-Homologie-Region 1
V/V	Volumen pro Volumen
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>

8.2 Literaturverzeichnis

Abercrombie M (1979)

Contact inhibition and malignancy. *Nature* 281(5729):259–262.

Adams CL, Nelson WJ, Smith SJ (1996)

Quantitative Analysis of Cadherin-Catenin-Actin Reorganization during Development of Cell-Cell Adhesion. *The Journal of Cell Biology* 135(6):1899–1911.

Aghib DF, McCrea PD (1995)

The E-Cadherin Complex Contains the *src* Substrate p120. *Experimental Cell Research* 218(1):359–369.

Aktary Z, Pasdar M (2012)

Plakoglobin: Role in Tumorigenesis and Metastasis. *International Journal of Cell Biology* 2012(5073):1–14.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2011)

Cadherine und Zell-Zell-Adhäsionen, in Alberts B et al., Schäfer U [Hg.]: *Molekularbiologie der Zelle*, 5. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, S. 1278-1300.

Anastasiadis PZ, Reynolds AB (2000)

The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *Journal of Cell Science* 113(8):1319–1334.

Asnagli L, Vass WC, Quadri R, Day PM, Qian X, Braverman R, Papageorge AG, Lowy DR (2010)

E-cadherin negatively regulates neoplastic growth in non-small cell lung cancer: role of Rho GTPases. *Oncogene* 29(19):2760–2771.

Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, Hirsch FR, Baron A, Bemis L, Gemmill RM, Drabkin HA, Franklin WA (2002a)

High-Throughput Tissue Microarray Analysis Used to Evaluate Biology and Prognostic Significance of the E-Cadherin Pathway in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 20(10):2417–2428.

Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA (2002b)

The E-cadherin cell–cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer* 36(2):115–124.

Buckley CD, Tan J, Anderson KL, Hanein D, Volkmann N, Weis WI, Nelson WJ, Dunn AR (2014)

The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science* 346(6209):1254211.

Cagle PT, Allen TC, Olsen RJ (2013)

Lung Cancer Biomarkers: Present Status and Future Development. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 137(9):1191–1198.

Castano J, Solanas G, Casagolda D, Raurell I, Villagrasa P, Bustelo XR, Garcia de Herrerros A, Dunach M (2007)

Specific Phosphorylation of p120-Catenin Regulatory Domain Differently Modulates Its Binding to RhoA. *Molecular and Cellular Biology* 27(5):1745–1757.

Cavallaro U, Christofori G (2004)

Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer* 4(2):118–132.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002)

Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer* 2(8):563–572.

Cha MY, Lee K, Kim M, Song JY, Lee KH, Park J, Chae YJ, Kim YH, Suh KH, Lee GS, Park SB, Kim MS (2012)

Antitumor activity of HM781-36B, a highly effective pan-HER inhibitor in erlotinib-resistant NSCLC and other EGFR-dependent cancer models. *International Journal of Cancer* 130(10):2445–2454.

- Chen H, Yu S, Chen C, Chang G, Chen C, Yuan A, Cheng C, Wang C, Terng H, Kao S, Chan W, Li H, Liu C, Singh S, Chen WJ, Chen JJW, Yang P (2007)**
A Five-Gene Signature and Clinical Outcome in Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine* 356(1):11–20.
- Chen X, Zhang H, Wang H, Zhu J, Zhou W, Zhang H, Zhao M, Su J, Gao W, Zhang L, Fei K, Zhang H, Wang H (2012)**
Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways. *Molecular Biology Reports* 39(4):3549–3556.
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK (2006)**
Reassessing Epithelial to Mesenchymal Transition as a Prerequisite for Carcinoma Invasion and Metastasis. *Cancer Research* 66(17):8319–8326.
- Datta R, Halder SK, Zhang B (2013)**
Role of TGF- β signaling in curcumin-mediated inhibition of tumorigenicity of human lung cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 139(4):563–572.
- Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB (2003)**
A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *The Journal of Cell Biology* 163(3):525–534.
- Deng B, Tan Q, Wang R, Jiang Y, Zhou J, Huang W (2014)**
P130cas is required for TGF- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition in lung cancer. *Oncology Letters* 8(1):454–460.
- Desai R, Sarpal R, Ishiyama N, Pellikka M, Ikura M, Tepass U (2013)**
Monomeric α -catenin links cadherin to the actin cytoskeleton. *Nature Cell Biology* 15(3):261–273.
- Drees F, Pokutta SY, Nelson WJ, Weis WI (2005)**
 α -Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin- β -Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. *Cell* 123(5):903–915.
- El-Hariry I, Pignatelli M, Lemoine NR (2001)**
FGF-1 and FGF-2 modulate the E-cadherin/catenin system in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *British Journal of Cancer* 84(12):1656–1663.
- Fichtner D, Lorenz B, Engin S, Deichmann C, Oelkers M, Janshoff A, Menke A, Wedlich D, Franz CM, Muller DJ (2014)**
Covalent and Density-Controlled Surface Immobilization of E-Cadherin for Adhesion Force Spectroscopy. *PLOS ONE* 9(3):e93123.
- Fidler IJ (2003)**
The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer* 3(6):453–458.
- Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HEM, Behrens J, Sommer T, Birchmeier W (2002)**
Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature Cell Biology* 4(3):222–231.
- Fukumoto Y, Shintani Y, Reynolds AB, Johnson KR, Wheelock MJ (2008)**
The regulatory or phosphorylation domain of p120 catenin controls E-cadherin dynamics at the plasma membrane. *Experimental Cell Research* 314(1):52–67.
- Gadgeel SM (2013)**
New Targets in Non-Small Cell Lung Cancer. *Current Oncology Reports* 15(4):411–423.
- Gupta GP, Massagué J (2006)**
Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 127(4):679–695.
- Hajra KM, Fearon ER (2002)**
Cadherin and catenin Alterations in Human Cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* 34(3):255–268.
- Hall RD, Gray JE, Chiappori AA (2013)**

- Beyond the Standard of Care: A Review of Novel Immunotherapy Trials for the Treatment of Lung Cancer. *Cancer Control* 20(1):22-31.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011)**
Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(5):646–674.
- Harris TJC, Tepass U (2010)**
Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(7):502–514.
- Hartsock A, Nelson WJ (2008)**
Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1778(3):660–669.
- Hong JY, Oh I, McCrea PD (2016)**
Phosphorylation and isoform use in p120-catenin during development and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863(1):102–114.
- Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R (1994)**
 β -Catenin Mediates the Interaction of the Cadherin-Catenin Complex with Epidermal Growth Factor Receptor. *The Journal of Cell Biology* 127(5):1375–1380.
- Huber HA, Nelson WJ, Weis WI (1997)**
Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of β -Catenin. *Cell* 90(5):871–882.
- Hung JY, Horn D, Woodruff K, Prihoda T, LeSaux C, Peters J, Tio F, Abboud-Werner SL (2014)**
Colony-stimulating factor 1 potentiates lung cancer bone metastasis. *Laboratory Investigation* 94(4):371–381.
- Ikushima H, Miyazono K (2010)**
TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 10(6):415–424.
- Ireton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F, Reynolds AB (2002)**
A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *The Journal of Cell Biology* 159(3):465–476.
- Jamora C, Fuchs E (2002)**
Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biology* 4(4):E101–E108.
- Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grünert S (2002)**
Ras and TGF β cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *The Journal of Cell Biology* 156(2):299–314.
- Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS (2008)**
Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 27(55):6920–6929.
- Kawaguchi J, Takeshita S, Kashima T, Imai T, Machinami R, Kudo A (1999)**
Expression and Function of the Splice Variant of the Human Cadherin-11 Gene in Subordination to Intact Cadherin-11. *Journal for Bone and Mineral Research* 14(5):764–775.
- Kim H, Yoo SB, Sun P, Jin Y, Jheon S, Lee CT, Chung J (2013)**
Alteration of the E-Cadherin/ β -Catenin Complex Is an Independent Poor Prognostic Factor in Lung Adenocarcinoma. *The Korean Journal of Pathology* 47(1):44-51.
- Kourtidis A, Yanagisawa M, Huvelde D, Copland JA, Anastasiadis PZ (2015)**
Pro-Tumorigenic Phosphorylation of p120 Catenin in Renal and Breast Cancer. *PLOS ONE* 10(6):e0129964.
- Krams M, Frahm SO, Kellner U, Mawrin C (2010)**

Grundlagen der Pathologie, in Krams M et al., Krams M [Hg.]: Kurzlehrbuch Pathologie. Stuttgart: Thieme Verlag, S. 3-27.

Kshitiz, Afzal J, Kim D, Levchenko A (2014)

Concise Review: Mechanotransduction via p190RhoGAP Regulates a Switch Between Cardiomyogenic and Endothelial Lineages in Adult Cardiac Progenitors. *Stem Cells* 32(8):1999–2007.

Laemmli UK (1970)

Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685.

Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014)

Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(3):178–196.

Liu Y, Dong Q, Zhao Y, Dong X, Miao Y, Dai S, Yang Z, Zhang D, Wang Y, Li Q, Zhao C, Wang E (2009)

p120-catenin isoforms 1A and 3A differently affect invasion and proliferation of lung cancer cells. *Experimental Cell Research* 315(5):890–898.

MacPherson IR, Hooper S, Serrels A, McGarry L, Ozanne BW, Harrington K, Frame MC, Sahai E, Brunton VG (2007)

p120-catenin is required for the collective invasion of squamous cell carcinoma cells via a phosphorylation-independent mechanism. *Oncogene* 26(36):5214–5228.

Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ (2005)

Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *Journal of Cell Science* 118(5):873–887.

Marnier DJ, Davis MA, Reynolds AB (2003)

EGFR signaling to p120-catenin through phosphorylation at Y228. *Journal of Cell Science* 117(8):1339–1350.

McCusker C, Cousin H, Neuner R, Alfandari D (2009)

Extracellular Cleavage of Cadherin-11 by ADAM Metalloproteases Is Essential for *Xenopus* Cranial Neural Crest Cell Migration. *Molecular Biology of the Cell* 20(1):78–89.

McLachlan RW, Yap AS (2007)

Not so simple: the complexity of phosphotyrosine signaling at cadherin adhesive contacts. *Journal of Molecular Medicine* 85(6):545–554.

Mège R, Gavard J, Lambert M (2006)

Regulation of cell–cell junctions by the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* 18(5):541–548.

Menke A, Giehl K (2012)

Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 524(1):48–55.

Miao Y, Liu N, Zhang Y, Liu Y, Yu J, Dai S, Xu H, Wang E (2010)

p120ctn isoform 1 expression significantly correlates with abnormal expression of E-cadherin and poor survival of lung cancer patients. *Medical Oncology* 27(3):880–886.

Molina-Ortiz I, Bartolome RA, Hernandez-Varas P, Colo GP, Teixido J (2009)

Overexpression of E-cadherin on Melanoma Cells Inhibits Chemokine-promoted Invasion Involving p190RhoGAP/p120ctn-dependent Inactivation of RhoA. *The Journal of Biological Chemistry* 284(22):15147–15157.

Morali OG, Delmas V, Moore R, Jeanney C, Thiery JP, Larue L (2001)

IGF-II induces rapid β -catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene* 20(36):4942 – 4950.

Nagafuchi A, Takeichi M (1988)

Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *The EMBO Journal* 7(12):3679–3684.

Nakashima H, Hashimoto N, Aoyama D, Kohnoh T, Sakamoto K, Kusunose M, Imaizumi K, Takeyama Y, Sato M, Kawabe T, Hasegawa Y (2012)

Involvement of the Transcription Factor Twist in Phenotype Alteration through Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 51(5):400–410.

Nassarre P, Gemmill RM, Potiron VA, Roche J, Lu X, Baron AE, Korch C, Garrett-Mayer E, Lagana A, Howe PH, Drabkin HA (2013)

Neuropilin-2 Is Upregulated in Lung Cancer Cells during TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Research* 73(23):7111–7121.

Nelson WJ (2008)

Regulation of cell–cell adhesion by the cadherin–catenin complex. *Biochemical Society Transactions* 36(2):149–155.

Nguyen TTV, Watanabe Y, Shiba A, Noguchi M, Itoh S, Kato M (2014)

TMEPAI/PMEPA1 enhances tumorigenic activities in lung cancer cells. *Cancer Science* 105(3):334–341.

Nollet F, Kools P, van Roy F (2000)

Phylogenetic Analysis of the Cadherin Superfamily allows Identification of Six Major Subfamilies Besides Several Solitary Members. *The Journal of Molecular Biology* 299(3):551–572.

Nuessle JM, Giehl K, Herzog R, Stracke S, Menke A (2011)

TGF β 1 suppresses vascular smooth muscle cell motility by expression of N-cadherin. *Biological Chemistry* 392(5):461–474.

Perl A, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G (1998)

A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392(6672):190–193.

Pickup M, Novitskiy S, Moses HL (2013)

The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer* 13(11):788–799.

Polakis P (2000)

Wnt signaling and cancer. *Genes & Development* 14(15):1837–1851.

Principe DR, Doll JA, Bauer J, Jung B, Munshi HG, Bartholin L, Pasche B, Lee C, Grippo PJ (2014)

TGF- β : Duality of Function Between Tumor Prevention and Carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 106(2):djt369.

Qian X, Karpova T, Sheppard AM, McNally J, Lowy DR (2004)

E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *The EMBO Journal* 23(8):1739–1748.

Reymond N, d'Água BB, Ridley AJ (2013)

Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer* 13(12):858–870.

Reynolds AB, Roczniak-Ferguson A (2004)

Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene* 23(48):7947–7956.

Ribeiro AS, Sousa B, Carreto L, Mendes N, Nobre AR, Ricardo S, Albergaria A, Cameselle-Teijeiro JF, Gerhard R, Söderberg O, Seruca R, Santos MA, Schmitt F, Paredes J (2013)

P-cadherin functional role is dependent on E-cadherin cellular context: a proof of concept using the breast cancer model. *Journal of Pathology* 229(5):705–718.

Saito R, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K (2009)

Thyroid Transcription Factor-1 Inhibits Transforming Growth Factor- β -Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma Cells. *Cancer Research* 69(7):2783–2791.

Santa Cruz Biotechnology (2015)

EGFR Antikörper (1005): sc-3

URL: <http://www.scbio.de/datasheet-03-egfr-1005-antibody.html>.

[Letzter Zugriff: 28.05.2015].

- Schackmann RC, Tenhagen M, van de Ven RAH, Derksen PWB (2013)**
p120-catenin in cancer - mechanisms, models and opportunities for intervention. *Journal of Cell Science* 126(16):3515–3525.
- Seidel B, Braeg S, Adler G, Wedlich D, Menke A (2004)**
E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 23(32):5532–5542.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015)**
Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65(1):5–29.
- Smythe WR, Williams JP, Wheelock MJ, Johnson KR, Kaiser LR, Albelda SM (1999)**
Cadherin and catenin expression in normal human bronchial epithelium and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 24(3):157–168.
- Taniuchi K, Nakagawa H, Hosokawa M, Nakamura T, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Katagiri T, Nakamura Y (2005)**
Overexpressed P-Cadherin/CDH3 Promotes Motility of Pancreatic Cancer Cells by Interacting with p120ctn and Activating Rho-Family GTPases. *Cancer Research* 65(8):3092–3099.
- Thiery JP (2002)**
Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2(6):442–454.
- Thiery JP (2003)**
Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current Opinion in Cell Biology* 15(6):740–746.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA (2009)**
Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 139(5):871–890.
- Thomas WA, Boscher C, Chu Y, Cuvelier D, Martinez-Rico C, Seddiki R, Heysch J, Ladoux B, Thiery JP, Mege R, Dufour S (2013)**
 α -Catenin and Vinculin Cooperate to Promote High E-cadherin-based Adhesion Strength. *The Journal of Biological Chemistry* 288(7):4957–4969.
- Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hummingbird DK, Reynolds AB (2000)**
Selective Uncoupling of p120ctn from E-cadherin Disrupts Strong Adhesion. *The Journal of Cell Biology* 148(1):189–201.
- Thoreson MA, Reynolds AB (2002)**
Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression. *Differentiation* 70(9-10):583–589.
- Tirino V, Camerlingo R, Bifulco K, Irollo E, Montella R, Paino F, Sessa G, Carriero MV, Normanno N, Rocco G, Pirozzi G (2013)**
TGF- β 1 exposure induces epithelial to mesenchymal transition both in CSCs and non-CSCs of the A549 cell line, leading to an increase of migration ability in the CD133+ A549 cell fraction. *Cell Death and Disease* 4(5):e620.
- Travis WD, Brambilla E, Riely GJ (2013)**
New Pathologic Classification of Lung Cancer: Relevance for Clinical Practice and Clinical Trials. *Journal of Clinical Oncology* 31(8):992–1001.
- van Hengel J, van Roy F (2007)**
Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773(1):78–88.
- Vázquez PF, Carlini MJ, Daroqui MC, Colombo L, Dalurzo ML, Smith DE, Grasselli J, Pallotta MG, Ehrlich M, Bal Kier Joffé EDB, Puricelli L (2013)**
TGF-beta specifically enhances the metastatic attributes of murine lung adenocarcinoma: implications for human non-small cell lung cancer. *Clinical & Experimental Metastasis* 30(8):993-1007.

- Villarejo A, Cortes-Cabrera A, Molina-Ortiz P, Portillo F, Cano A (2014)**
Differential Role of Snail1 and Snail2 Zinc Fingers in E-cadherin Repression and Epithelial to Mesenchymal Transition. *The Journal of Biological Chemistry* 289(2):930–941.
- Vleminckx K, Vakaet L, Mareel M, Fiers W, van Roy F (1991)**
Genetic manipulation of E-cadherin expression by Epithelial tumor cells Reveals an Invasion Suppressor Role. *Cell* 66(1):107–119.
- Vogelmann R, Nguyen-tat M, Giehl K, Adler G, Wedlich D, Menke A (2005)**
TGF β -induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *Journal of Cell Science* 118(20):4901–4912.
- Wang E, Liu Y, Xu H, Dai S, Liu N, Xie Y, Yuan X (2006)**
Abnormal expression and clinicopathologic significance of p120-catenin in lung cancer. *Histology and Histopathology* 21(8):841–847.
- Weir BA, Woo MS, Getz G, Perner S, Ding L, Beroukhir R, Lin WM, Province MA, Kraja A, Johnson LA, Shah K, Sato M, Thomas RK, Barletta JA, Borecki IB, Broderick S, Chang AC, Chiang DY, Chiriac LR, Cho J, Fujii Y, Gazdar AF, Giordano T, Greulich H, Hanna M, Johnson BE, Kris MG, Lash A, Lin L, Lindeman N, Mardis ER, McPherson JD, Minna JD, Morgan MB, Nadel M, Orringer MB, Osborne JR, Ozenberger B, Ramos AH, Robinson J, Roth JA, Rusch V, Sasaki H, Shepherd F, Sougnez C, Spitz MR, Tsao M, Twomey D, Verhaak RGW, Weinstock GM, Wheeler DA, Winckler W, Yoshizawa A, Yu S, Zakowski MF, Zhang Q, Beer DG, Wistuba II, Watson MA, Garraway LA, Ladanyi M, Travis WD, Pao W, Rubin MA, Gabriel SB, Gibbs RA, Varmus HE, Wilson RK, Lander ES, Meyerson M (2007)**
Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 450(7171):893–898.
- Wheelock MJ, Johnson KR (2003)**
Cadherins as Modulators of Cellular Phenotype. *Annual Review of Cell Development Biology* 19(1):207–235.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR (2008)**
Cadherin switching. *Journal of Cell Science* 121(6):727–735.
- Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, Reynolds AB (2006)**
p120-Catenin and p190RhoGAP Regulate Cell-Cell Adhesion by Coordinating Antagonism between Rac and Rho. *Cell* 127(5):1027–1039.
- Wood SL, Pernemalm M, Crosbie PA, Whetton AD (2015)**
Molecular histology of lung cancer: From targets to treatments. *Cancer Treatment Reviews* 41(4):361–375.
- Xing Y, Takemaru K, Liu J, Berndt JD, Zheng JJ, Moon RT, Xu W (2008)**
Crystal Structure of a Full-Length β -Catenin. *Structure* 16(3):478–487.
- Xi Y, Chen Y (2014)**
Wnt signaling pathway: Implications for therapy in lung cancer and bone metastasis. *Cancer Letters* 353(1):8–16.
- Xu J, Lamouille S, Derynck R (2009)**
TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research* 19(2):156–172.
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ (2005)**
Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex. *Cell* 123(5):889–901.
- Yang H, Wang L, Zhao J, Chen Y, Lei Z, Liu X, Xia W, Guo L, Zhang H (2015)**
TGF- β -activated SMAD3/4 complex transcriptionally upregulates N-cadherin expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 87(3):249–257.
- 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. *PLOS ONE* 9(6):e99763.
- Yap AS, Niessen CM, Gumb BM (1998)**

The Juxtamembrane Region of the Cadherin Cytoplasmic Tail Supports Lateral Clustering, Adhesive Strengthening, and Interaction with p120 ctn. *The Journal of Cell Biology* 143(3):779–789.

Yoo JY, Yang S, Lee JE, Cho DG, Kim HK, Kim SH, Kim IS, Hong JT, Sung JH, Son BC, Lee SW (2012)

E-cadherin as a predictive marker of brain metastasis in non-small-cell lung cancer, and its regulation by pioglitazone in a preclinical model. *Journal of Neuro-Oncology* 109(2):219–227.

Yoshida-Noro C, Suzuki N, Takeichi M (1984)

Molecular Nature of the Calcium-Dependent Cell-Cell Adhesion System in Mouse Teratocarcinoma and Embryonic Cells Studied with a Monoclonal Antibody. *Developmental Biology* 101(1):19–27.

Yu Y, He J (2013)

Molecular classification of non-small-cell lung cancer: diagnosis, individualized treatment, and prognosis. *Frontiers of Medicine* 7(2):157–171.

Yu Y, Xiao C, Tan L, Wang Q, Li X, Feng Y (2013)

Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *British Journal of Cancer* 110(3):724–732.

Zhang H, Liu J, Yue D, Gao L, Wang D, Zhang H, Wang C (2013)

Clinical significance of E-cadherin, β -catenin, vimentin and S100A4 expression in completely resected squamous cell lung carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* 66(11):937–945.

Zhang YE (2009)

Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Research* 19(1):128–139.

Zhang Q, Yu N, Lee C (2014a)

Mysteries of TGF- β paradox in benign and malignant Cells. *Frontiers in Oncology* 4(94).

Zhang Y, Zhao Y, Jiang G, Zhang X, Zhao H, Wu J, Xu K, Wang E, André F (2014b)

Impact of p120-catenin Isoforms 1A and 3A on Epithelial Mesenchymal Transition of Lung Cancer Cells Expressing E-cadherin in Different Subcellular Locations. *PLOS ONE* 9(2):e88064.

Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A (2000)

Plakoglobin and β -catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *Journal of Cell Science* 113(18):3127–3139.

8.3 Veröffentlichungen

Abstracts:

Schneider, T., Panjas, C., Giehl, K., Menke, A.

TGF β 1-induced migration of adenocarcinoma of the lung includes inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion.

ERS, European Respiratory Society, International Congress, München, 2014.

Giehl, K., Schneider, T., Panjas, C., Menke, A.

TGF β 1-stimulated EMT and migration of lung adenocarcinoma cells and oncogenic K-Ras.

3rd Annual DZL Internal Meeting, Heidelberg, 2014.

Giehl, K., Schneider, T., Panjas, C., Menke, A.

TGF β 1-stimulated EMT and migration of lung adenocarcinoma cells correlates with oncogenic K-Ras.

37th International Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ), Regensburg, 2014.

Giehl, K., Beilke, S., Schneider, T., Panjas, C., Menke, A.

TGF β 1-stimulated EMT and migration of lung adenocarcinoma cells depends on oncogenic K-Ras.

The 6th International EMT Meeting (TEMTIA), Alicante, Spain, 2013.

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig 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 vorgelegten 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 eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

8.5 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Promotion beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Andre Menke für das Überlassen des behandelten Themas, die erstklassige Betreuung im Labor und die ausgiebige Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Frau Professorin Klaudia Giehl für die freundliche Zusammenarbeit im Labor und die Hilfestellungen bei methodischen Fragestellungen.

Abschließend gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie solider Tumore für die geleistete Unterstützung und gute Zusammenarbeit im Labor.

8.6 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der vorliegenden Version der Arbeit entfernt.