Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Guido Adler

Charakterisierung des Einflusses von $p120^{ctn}$ auf den E-Cadherin-Adhäsionskomplex

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Melanie Wünsch
Schwäbisch Gmünd

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Andre Menke

2. Berichterstatter: PD Dr. Rainer Voisard

Tag der Promotion: 18.12.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **IV**

1 Einleitung **1**
1.1 Das Pankreaskarzinom 1
1.2 Bildung von Metastase 2
1.3 Zelladhäsion in Epithelien 3
1.4 Cadherine 4
1.5 E-Cadherin 5
1.6 Catenine 6
1.7 p120-Catenin ($p120^{ctn}$) 7
1.8 Rho-GTPasen 10
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit 14

2 Material und Methoden **15**
2.1 Material 15
2.2 Methoden 19

3 Ergebnisse **35**
3.1 Analyse der E-Cadherin-$p120^{ctn}$-Interaktion in epithelialen Zelllinien 35
3.2 Einflüsse der Konfluenz auf die Assoziation von $p120^{ctn}$, β-Catenin und α-Catenin mit E-Cadherin 41
3.3 Beeinflussung von E-Cadherin-assoziiertem $p120^{ctn}$ durch Veränderung der extrazellulären Calcium-Konzentration 44
3.4 Phosphorylierung von $p120^{ctn}$ an verschiedenen Tyrosin-Resten 48
3.5 Einfluss der kleinen GTPasen Rho und Rac1 auf den E-Cadherin-Adhäsionskomplex 52

4 Diskusion 74

4.1. Die zelluläre p120^{ctn}-Konentration nimmt in MCF-7, MDA-MB 468 und PA-TU 8902 mit der Wachstumsdichte der Zellen zu 74

4.2 Beeinflussung von p120^{ctn} durch extrazelluläres Calcium 76

4.3 Tyrosin-Phosphorylierung von p120^{ctn} 79

4.4 Einfluss von p120^{ctn} auf die kleinen GTPasen Rho und Rac1 83

5 Zusammenfassung 85

6 Literaturverzeichnis 87

Danksagung 94

Lebenslauf 95

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	*Adenomatous polyposis coli*
ARVCF	*Armadillo repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome*
ATCC	*American type culture collection*
APS	Ammoniumperoxidisulfat
BCA	Bicinchoninic Acid
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat
BSA	Rinderserumalbum *(Bovine serume albumine)*
CAM	*cell adhesion molecule*
CASK	*Calcium/Calmodulin-dependent serine protein kinase*
CMF-PBS	Ca^{2+}-/Mg^{2+}-freies PBS
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CBD	Catenin-bindende Domäne
Cdc42	*Cell division cycle 42*
Cy3	Indocarbocyanin
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC	Extrazelluläre Cadherin Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor *(Epidermal growth factor)*
EGFP	*Enhanced green fluorescent protein*
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGTA	Ethylenglycol bis (β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
Fc	*Fragment crystallizable*
FCS	Fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	Guanin Nukleotid Dissoziations Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin Nukleotid Austauschfaktor
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (*hour*)
HRP	Meerrettich-Peroxidase *(Horseradish peroxidase)*
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
JMD	Juxtamembrandomäne
k	Kilo
kDa	Kilo-Dalton
KRH	Krebs-Ringer-HEPES
M	Molarität [mol/l]
m	milli
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
mk	monoklonal
MG	Molekulargewicht
NBT	4-Nitroblau Tetrazolium Chlorid
N-Cadherin	Neuronales Cadherin
NOP	Nonidet P-40
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PFA	Paraformaldehyd

pk	polyklonal
P-Cadherin	Plazentares Cadherin
PVDF-Membran	Polyvinylidene difluorid Membran
Rac1	*ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
RBD	Rho-bindende Domäne
R-Cadherin	Retinales Cadherin
Rho	*ras homolog*
RIPA	Radioimmunopräzipitations-Assay
ROCK	Rho-Kinase-Inhibitor
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Src	*Rous sarcoma oncogene cellular homolog*
STI	Sojabohnen Trypsin Inhibitor
TE	Tris-EDTA
TBS	*Tris buffered saline*
TBST	*Tris buffered saline* -Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyoxyethylen-p-t-octylphenol
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
v/v	Vomlumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
WB	Western Blot
ZO	Zonulae occludentes

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreas ist ein lebenswichtiges Organ, das aus einem exokrinen und einem endokrinen Anteil besteht. Der exokrine Anteil produziert verschiedene Enzyme zur Aufspaltung der Nahrungsbestandteile, während der endokrine Anteil für die Herstellung von Insulin und Glukagon zur Regulation des Blutzuckerspiegels verantwortlich ist. Das Pankreas gliedert sich in drei Abschnitte: den Kopf (*Caput*), den Körper (*Corpus*) und den Schwanz (*Cauda*).

In Deutschland sind 3% aller Krebserkrankungen Pankreaskarzinome. Sie stellen die vierthäufigste Krebstodesursache bei Frauen und die fünfthäufigste bei Männern [20, 45]. Die 5-Jahre-Überlebensrate ist so niedrig wie bei keiner anderen Krebserkrankung [13, 45]. Die relativ schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms ergibt sich aus der späten Diagnosestellung, da bei dieser Krebserkrankung klassische Frühsymptome fehlen. 80% der Tumoren werden aufgrund dessen erst sehr spät entdeckt. Häufig hat zu diesem Zeitpunkt der Tumor bereits eine beachtliche Größe erreicht und Metastasen gebildet [19, 31, 46]. Eine vollständige Tumorentfernung ist dann in den allermeisten Fällen nicht mehr möglich, so dass für die Patienten kaum noch Aussicht auf Heilung besteht. Meist versterben diese Patienten innerhalb der ersten 6 Monate nach Diagnosestellung [19, 31, 45]. Der Versuch, die Erkrankung mit Chemotherapie oder Bestrahlung zu behandeln, bringt selten den gewünschten Erfolg. Aber auch bei operablen Tumoren im Frühstadium der Erkrankung beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung nur 9 - 18 Monate [45].

Die meisten Pankreaskarzinome entstehen im Pankreaskopf und entwickeln sich in den Ausführungsgängen der Drüsen. Man spricht daher vom duktalen Adenokarzinom [45]. Über die Ätiologie ist bislang noch wenig bekannt. Es wird jedoch diskutiert, dass der Konsum von Zigaretten und Alkohol, sowie der Verzehr von Fisch bzw. Fleisch die Entstehung des Pankreaskarzinoms begünstigen [13, 45]. In seltenen Fälen ist eine familiäre Disposition für die Entstehung verantwortlich [13].

1.2 Bildung von Metastasen

Die Fähigkeit Metastasen zu bilden kennzeichnet maligne Tumoren. Metastasen entstehen, wenn sich Krebszellen vom Primärtumor ablösen und invasiv in umgebende Strukturen hineinwachsen. Hierbei werden anatomische Grenzen überwunden. Dazu zählt auch die Basalmembran, die wichtig für die Integrität epithelialer Zellverbände ist. Durch die entstandene Lücke können die malignen Zellen nun aktiv in Blut- oder Lymphgefäße einwandern. Über die Blutbahn (hämatogen) oder über Lymphabflusswege (lymphogen) gelangen sie in andere Körperregionen und siedeln sich dort ab. Es entstehen Tochtertumoren in zunächst nicht befallenen Organen. Über die Hälfte der Patienten mit Pankreaskarzinom haben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Fernmetastasen gebildet, die im weiteren Krankheitsverlauf zum Tode führen [13, 24]. Eine entscheidende Voraussetzung für die Entstehung von Metastasen ist im Verlust der Zell-Zell-Kontakte zu sehen. Durch die Reduktion dieser Zell-Zell-Verbindungen und die Inaktivierung der Adhäsionskontakte wird es den malignen Zellen ermöglicht, sich aus ihrem Zellverband zu lösen und in benachbartes Gewebe einzudringen.

Der Verlust der Fähigkeit stabile Zell-Zell-Verbindungen zu bilden, ist unter anderem auf die Reduktion E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Kontakte (*Adherens Junctions*) zurückzuführen [39, 58]. E-Cadherine sind die wichtigsten Adhäsionsmoleküle in epithelialen Geweben. Die von ihnen vermittelte Zell-Zell-Adhäsion ist in den meisten Karzinomen erheblich verringert [56]. Anstelle davon ist häufig eine gesteigerte Expression von mesenchymalen Cadherinen, wie N- und R-Cadherin oder Cadherin 11 zu beobachten, was gleichzeitig mit einer gesteigerten Invasivität einhergeht [32, 46, 63]. Dieser Wechsel im Expressionsmuster der Cadherine ist eines der Kennzeichen der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) [26, 32, 51]. Aber nicht nur die Expression der Cadherine verändert sich, es kommt auch zu einem Verlust von Cytokeratinen sowie einer gesteigerten Produktion von Vimentin [26].

Als weiteres Kennzeichen der EMT ist die Aufgabe des epithelialen Phenotyps zugunsten eines mesenchymalen zu nennen. Mesenchymale Zellen sind nur locker mit der umgebenden extrazellulären Matrix verbunden und weisen eine

gesteigerte Motilität auf [26, 51]. Die EMT ist wichtig für viele Stufen der embryonalen Entwicklung. Hierunter fallen unter anderem die Entwicklung von Neuralleistenzellen, die Entstehung von mesenchymalem Gewebe sowie von Zellen des peripheren Nervensystems. Aber auch die Wundheilung ist auf Prozesse der EMT angewiesen. Unabhängig davon stellt sie einen fundamentalen Mechanismus für die Entstehung von Tumoren und Metastasen in adulten Organsimen dar [26, 41, 51].

1.3 Zelladhäsion in Epithelien

Die Zelladhäsion und die interzelluläre Kommunikation stellen eine Grundvoraussetzung für die Entstehung komplexer Organismen dar. Sie ermöglichen eine Differenzierung und Polarisierung der Zellen und somit die Spezialisierung zu Geweben und Organen [6, 50]. Die Zelladhäsion wird durch zahlreiche Zelladhäsionsmoleküle (CAMs = *cell adhesion molecules*) vermittelt. Hierbei handelt es sich um Transmembranproteine, die mit ihrem extrazellulären Anteil Kontakte zu Nachbarzellen oder der extrazellulären Matrix herstellen. Der intrazelluläre Anteil dieser transmembranen Adhäsionsmoleküle dient der Verankerung mit dem Cytoskelett der Zelle.

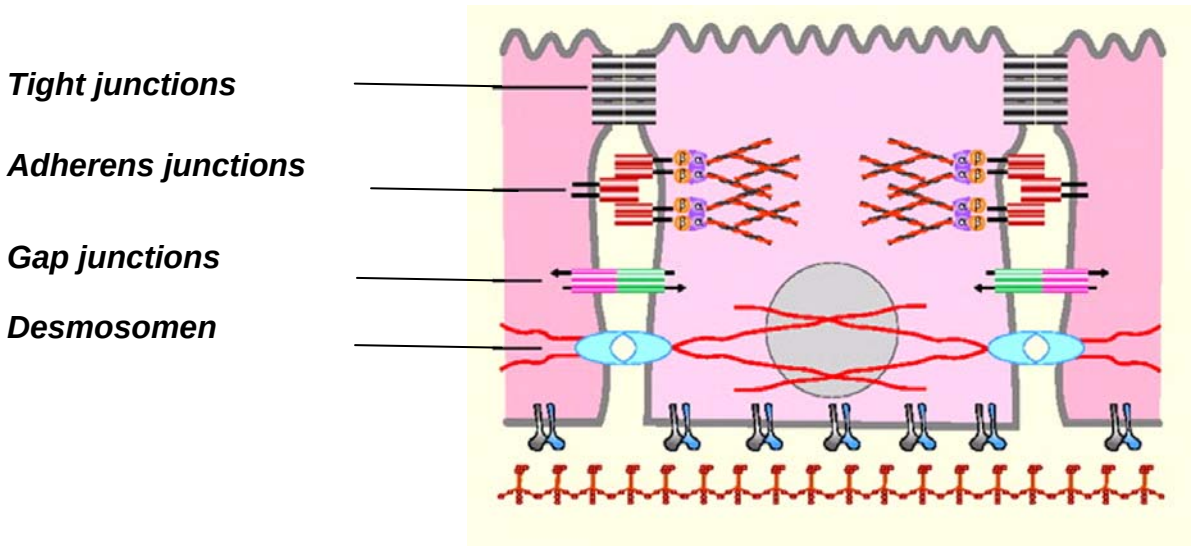


Abbildung 1: Schema der Zell-Zell-Adhäsion epithelialer Zellen. Abbildung verändert nach Radisky [41].

Die Zelladhäsionsmoleküle spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Kommunikation der Zellen untereinander, da sie in viele Signaltransduktionswege

eingebunden sind. Zellkontakte unterliegen einer hohen Dynamik und können je nach Erfordernis rasch gelöst und wieder neu errichtet werden. Die interzelluläre Adhäsion wird von Cadherinen und der Immunglobulin-Superfamilie vermittelt, während Selectine, Mucine und Integrine für die Zell-Matrix-Adhäsion verantwortlich sind. Die *Adherens junctions* sind in Epithelien als gürtelförmige *Zonula adhaerens* ausgebildet, wodurch die Zelle rundherum mit ihrer Nachbarzelle verbunden wird. Apikal der *Adherens junctions* befinden sich die abdichtenden *Tight junctions* (*Zonlua occludens*) und basolateral die fleckförmigen *Desmosomen*. Gemeinsam bilden diese drei Strukturen den Haftkomplex [34]. Cadherine gehen calciumabhängige, homophile Bindungen mit den Cadherinen benachbarter Zellen ein.

1.4 Cadherine

Cadherine sind calciumabhängige transmembranäre Glykoproteine, die die Grundlage der calciumabhängigen Zell-Zell-Adhäsion darstellen. In Gegenwart von Calcium bilden sie stabile homophile Kontakte mit gleichen Cadherinen benachbarter Zellen aus [40, 50]. Aus der Superfamilie der Cadherine sind mehr als 100 verschiedene Cadherine identifiziert. Alle Mitglieder weisen in ihrer extrazellulären Domäne mindestens eine charakteristische extrazelluläre Cadherin (EC) Domäne auf [50], die aus ungefähr 110 Aminosäuren besteht. Am besten untersucht sind die klassischen Cadherine. Hierzu gehören das epithelialen E-, das neuronalen N- und das plazentaren P-Cadherin.

Neben ihrer fundamentalen Aufgabe für die Aufrechterhaltung der Polarität epithelialer Zellen spielen Cadherine eine wichtige Rolle während der Embryogenese wo ein spezifisches Cadherin-Expressionsmuster bestimmte Zelltypen und Gewebe gekennzeichnet [40].

1.5 E-Cadherin

E-Cadherin gehört zu den klassischen Cadherinen und ist für die Ausbildung funktionsfähiger Zell-Zell-Kontakte in epithelialem Gewebe unverzichtbar [30]. calciumabhängig vermittelt es spezifische Zell-Zell Interaktionen, wohingegen es intrazellulär mit dem Aktin Cytoskelett in Adherens junctions oder dem Intermediärfilament System in Desmosomen assoziiert ist [40]. Alle klassischen Cadherinen zeichnen sich durch fünf extrazelluläre Cadherin *repeats* aus, gefolgt von einer einfachen Membran-Anker-Domäne, sowie einem hochkonservierten C-terminalen intrazellulären Anteil [40]. Zwischen den einzelnen EC-Domänen können jeweils drei Calcium-Ionen gebunden werden. Calcium wirkt protektiv gegen proteolytische Degradation und ist notwendig für die Proteinstabilität und Konformation [30]. E-Cadherin liegt als paralleles *cis*-Dimer vor [47]. In dieser Konformation kann es eine *trans*-Dimerisierung mit einem identischen Cadherin-Dimer der Nachbarzelle eingehen.

Aufgrund seiner herausragenden Stellung für die Stabilität und Funktionsfähigkeit der Zelladhäsion wird E-Cadherin als Tumorsuppressor klassifiziert. Ein Verlust von E-Cadherin geht mit einer gesteigerten Invasivität tumoröser Zellen einher [6, 18, 39, 56, 58].

Damit Cadherine funktionsfähige Zell-Zell-Kontakte ausbilden können, ist ihre Assoziation mit dem Cytoskelett notwendig. Diese Verbindung wird durch Proteine der Catenin-Familie hergestellt. Die hochkonservierte cytoplasmatische Region der Cadherine bindet an β-Catenin oder γ-Catenin (Plakoglobin). β–Catenin bindet wiederum an α–Catenin. Dieses Catenin hat verschiedene cytoplasmatische Bindungspartner, unter anderem Aktin. Ging man bislang davon aus, dass α-Catenin für die Verankerung des Cadherin-β-Catenin-Komplexes mit dem Aktin-Cytoskelett verantwortlich ist, belegen neue Untersuchungen, dass es nicht simultan an β-Catenin und Aktin binden kann [40, 57].

Mehrere verschiedene Kandidaten für die Verbindung des Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Aktin-Cytoskelett wurden bislang gefunden. Als erstes ist hier Nectin zu nennen, dessen cytoplasmatische Domäne an L-Afadin bindet, welches an Aktin und α-Catenin binden kann. Aber auch β–Catenin könnte eine Rolle spielen, da sein C-Terminus ein Bindungsmotiv enthält, welches mit Lin7

interagiert [34]. Lin7 steht über CASK mit anderen Proteinen des Aktin-Cytoskeletts in Verbindung. Desweiteren wurden Shroom, Vezatin, Bitesize und Moesin als mögliche Ankerproteine genannt [57]. Als weiteres Catenin bindet p120-Catenin ($p120^{ctn}$) an E-Cadherin. Die cytoplasmatische $p120^{ctn}$-Bindungsstelle wird als juxtamembrane Domäne (JMD) bezeichnet und befindet sich außerhalb der β-Catenin-Bindungsstelle [43].

1.6 Catenine

Für die Funktion der Cadherine ist ihre Assoziation mit Proteinen der Catenin-Familie wichtig. Ohne diese Verbindung verlieren die Cadherine ihre Fähigkeit, eine stabile Zell-Zell-Adhäsion auszubilden [37].

Die Zugehörigkeit der verschiedenen Catenine zur Catenin-Familie ergibt sich durch ein aus 42 Aminosäuren bestehendes Motiv, welches 12 Mal wiederholt wird (Armadillo-*repeat*-Domäne). β-Catenin bindet über seine Armadillo-*repeats* direkt an die cytoplasmatische Domäne von klassischen Cadherinen (Catenin-bindende Domäne, CBD), während sein N-terminales Ende an α-Catenin bindet [25, 27]. β–Catenin ist für die Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion, sowie den Wnt/Wingless-Signaltransduktionsweg unerlässlich [25, 27, 57]. Die Interaktion zwischen β-Catenin und E-Cadherin ist sehr stark und wird durch Phosphorylierung reguliert [40].

Das α-Catenin-Monomer kann an β-Catenin binden, während das α-Catenin-Dimer an β-Aktin bindet. α-Catenin kann also sowohl β-Catenin, als auch β-Aktin binden, aber nicht gleichzeitig. Es dient also nicht der Verankerung des Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Aktin-Cytoskelett. Dennoch scheint es für die Bündelung von Aktin-Filamenten und die Dynamik der Zell-Zell-Kontakte wichtig zu sein [40].

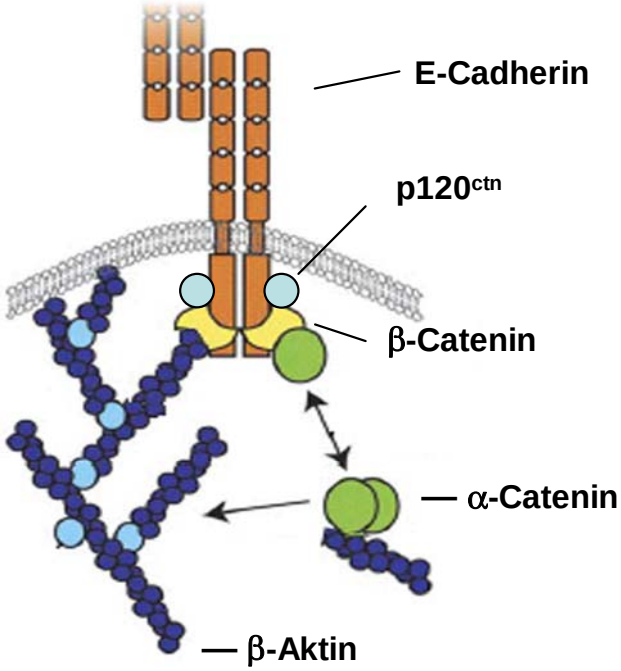


Abbildung 2: Der Cadherin-Catenin-Komplex, bestehend aus einem transmembranen Cadherin-Homodimer und cytoplasmatischen Cateninen. Abbildung verändert nach Drees et al. [15].

1.7 p120-Catenin (p120^{ctn})

p120-Catenin (p120^{ctn}) ist der Prototyp einer Subfamilie von Proteinen mit Armadillo-Domäne, die außer p120^{ctn} auch p0071, δ–Catenin, ARVCF und die entfernter verwandten Plakophiline umfasst [25, 43]. p120^{ctn} wurde ursprünglich als Substrat der Proteinkinase Src (Src = Rous sarcoma oncogene cellular homolog) identifiziert [42] und weist wie die anderen Catenine, eine Armadillo-*repeat*-Domänen auf. Diese besteht aus 10 Armadillo-Wiederholungen (Arm-*repeats*), unterbrochen durch kurze Schlaufen in den *repeats* 4, 6 und 9 [3, 42]. Mit dieser Armadillo-*repeat*-Domäne bindet p120^{ctn} an die juxtamembranäre Domäne der klassischen Cadherine [40, 42, 43]. Dadurch wird ein Clustern von Cadherinen an der Zelloberfläche hervorgerufen, das die Cadherin-Catenin-Komplexe stabilisiert und damit die zelluläre Adhäsion verstärkt [52, 63]. Eine

Kernaufgabe von p120^{ctn} ist die Regulation des Cadherin-*Turnovers* an der Zell-Oberfläche, was sich in einer deutlich erhöhten Halbwertszeit der an p120^{ctn}-gebundenen Cadherine, niederschlägt [12, 25, 28, 61]. p120^{ctn} kann direkt die Stärke der Zell-Zell-Adhäsion beeinflussen, indem es die Menge an Cadherinen, die für eine Adhäsion zur Verfügung steht, reguliert [12, 25, 61]. Allerdings erfolgt diese Regulation nur auf Proteinebene, da p120^{ctn} keine Auswirkung auf die mRNA-Spiegel der Cadherine hat. Das p120^{ctn}-Molekül verhindert den endocytotischen Abbau von E-Cadherin und schützt es vor der Degradation durch Proteasen [12].

Sowohl epitheliale, als auch mesenchymale Zellen exprimieren p120^{ctn}. Hierbei weisen die unterschiedlichen Zelltypen gleichzeitig verschiedene Isoformen in einem charakteristischen Verhältnis auf. Diese Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen des p120^{ctn} Gens. Spleißen am N-terminalen Ende ruft verschiedener Startcodons hervor, so dass die Isoformen 1–4 entstehen. C-terminales Spleißen bewirkt den Gebrauch der Exone A, B, A und B oder keines von beiden. Das Exon B kodiert für ein Kernexportsignal (NES). In seltenen Fällen kommt ein Exon C vor, welches sich innerhalb des Arm-*repeats* 6 befindet.

Die p120^{ctn} Isoform mit dem größten Molekulargewicht ist p120^{ctn} 1ABC. Hier sind alle 3 Exons enthalten und das Startcodon 1 wird verwendet. Die Isoform 4 ist die kürzeste und kommt *in vivo* nur selten vor. Verschiedene Zelltypen weisen hierbei ein unterschiedliches Expressionsmuster der p120^{ctn}-Isoformen auf [42, 43, 54].

Die Isoform 1 ist vor allem in Makrophagen und Fibroblasten enthalten und besitzt eine Coiled-coil Domäne. Ein Motiv das wichtig für Protein-Protein-Interaktionen ist und ein Hinweis auf dynamischere Cadherin-Catenin-Interaktionen, sowie eine gesteigerte Motilität sein könnte. In epithelialen Zellen trifft man vor allem die p120^{ctn}-Isoform 3A an, die ein kleineres Molekulargewicht und keine Coiled-coil Domäne hat [1, 3, 43].

Die Armadillo-*repeat*-Domäne, die für die Interaktion mit der juxtamembranen Domäne der klassischen Cadherine zuständig ist, bleibt von diesen Spleißvorgängen ausgenommen. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des p120^{ctn} Proteins.

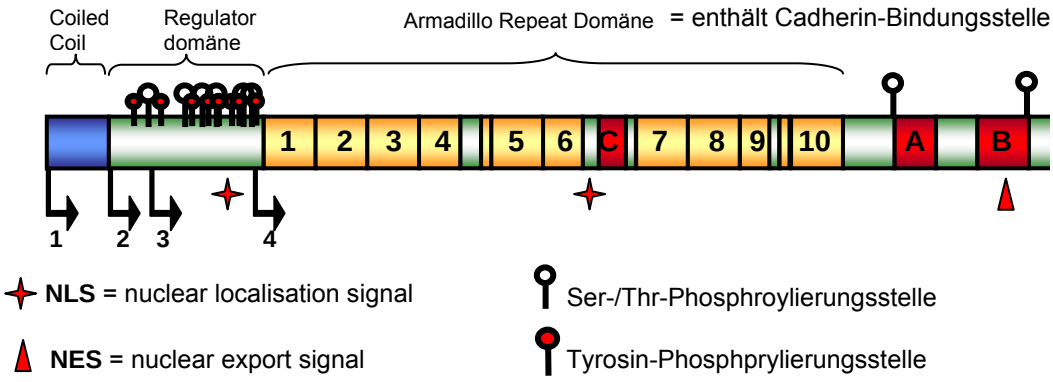


Abbildung 3: Schematische Darstellung des p120^{ctn} Proteins. Die zentrale Armadillo-Reapea-t Domäne enthält 10 Arm Wiederholungen, die in Arm-Repeat 4, 6 und 9 durch kurze Schlaufen unterbrochen werden. Alternatives Spleißen ergibt die Startcodons 1- 4, sowie die Exons A, B und C. Die Regulatordomäne enthält verschiedene Phosphorylierungsstellen und, gemeinsam mit Arm 6, ein Kernlokalisations-signal (NLS). Abbildung verändert nach Reynolds [43].

In der Regulator-Domäne befinden sich die allermeisten Phosphorylierungsstellen von p120^{ctn}. Da in dieser Domäne die verschiedenen Aktivitäten des Proteins moduliert werden, liegt der Schluss nahe, dass die Funktion von p120^{ctn} durch Phosphorylierung reguliert wird [43]. Wachstumsfaktoren wie *EGF*, *CSF*, *PDGF* und *VEGF* bewirken eine Aktivierung unterschiedlicher Src- und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, deren Aktivierung ebenfalls die Zell-Zell-Adhäsion beeinflussen und p120^{ctn} an verschiedenen Tyrosin-, sowie Serin-/Threonin-Resten phosphorylieren [14, 33, 54]. Hierdurch können unterschiedliche intrazelluläre Signal-Transduktionswege, die der Modulation der Cadherin-basierenden Adhäsion dienen, verknüpft werden. Während die Serin-/Threonin-Phosphorylierung an den meisten Stellen konstitutiv ist, bedarf die Tyrosin-Phophorylierung einer Wachstumsfaktor-Stimulation [60]. Außer der Modulation der auf Cadherinen basierenden Adhäsion, wird auch das Bindungsverhalten der kleinen Rho-GTPasen RhoA, sowie die Assoziation mit den Mikrotubuli durch Phosphorylierung von p120^{ctn} reguliert [10]. Die Bindung von p120^{ctn} an Mikrotubuli kann entweder direkt oder indirekt über die Bindung an das Motorprotein Kinesin erfolgen [17, 62]. Diese dient auch dem vesikulären Transport von Cadherinen entlang der Mikrotubuli. p120^{ctn} ist in epithelialem Gewebe normaler Weise an E-Cadherin gebunden und liegt membranständig vor.

Nur mit Hilfe dieser Bindung ist ein Cadherin-*Clustering* möglich, und die Halbwertszeit der Cadherine wird deutlich erhöht [52, 64]. Ohne E-Cadherine befindet sich $p120^{ctn}$ im Cytoplasma oder im Kern [5]. Im Cytoplasma kann es mit den kleinen Rho-GTPasen, RhoA, Cdc42 und Rac sowie anderen Proteinen interagieren [3, 25, 36].

Es konnte gezeigt werden, dass $p120^{ctn}$ in verschiedenen Karzinomen ganz fehlt, in veränderter Form vorliegt, oder im Cytoplasma zu finden ist, was jeweils für eine schlechte Prognose spricht [5, 53]. Durch die cytoplasmatische Ansammlung kann $p120^{ctn}$ Signalkaskaden aktivieren, die an der Zellproliferation beteiligt sind. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Motilität der Tumorzellen, was wiederum eine vermehrte Invasivität bedeutet [52]. Nukleäres $p120^{ctn}$ kann an den Transkripitonsrepressor Kaiso binden. Es sorgt so für die Dissoziation von Kaiso von der DNA, wodurch die reprimierte DNA abgelesen werden kann. Kaiso ist ein Zinkfingerprotein und beeinflusst als Transkriptionsrepressor unter anderem den kanonischen Wnt-β-Catenin Signalweg [38, 49, 55]. In Caenorhabditis elegans und Drosophila ist $p120^{ctn}$ nicht essentiell, obwohl diese Organismen nur ein Gen besitzen, das mit $p120^{ctn}$ vergleichbar ist und keine anderen Proteine dessen Funktion übernehmen können [25]. Dahingegen ist ein Knock-out von $p120^{ctn}$ in der Maus oder in Xenopus laevis bereits im frühen Embyonalstadium letal [25].

1.8 Rho-GTPasen

Die Funktion der Cadherine hängt entscheidend von ihrer Interaktion mit dem Aktin-Cytoskelett ab. Nur durch den Aufbau und die Dynamik der Aktin-Filamente kann die Verankerung des Cadherin-Catenin-Komplexes am Cytoskelett erfolgen. Hauptregulatoren des Aktin-Cytoskeletts in allen eukaryontischen Zellen sind die Mitglieder der Rho-GTPasen Familie, insbesondere RhoA, Rac1 [8] und Cdc42 [23]. Die Rho-GTPasen agieren als „molekulare Schalter“, die zwischen aktiven, GTP gebundenem, und inaktivem, GDP gebundenem, Zustand wechseln können. Die Aktivierung erfolgt über GEFs (Guanin Nukleotid Austauschfaktoren), die den Austausch von GDP in GTP bewirken, während die Inaktivierung durch Hydrolyse von GTP erfolgt. Diese wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) hervorgerufen, welche die niedrige intrinsische GTPase-Aktivität verstärken und

somit die Inaktivierung beschleunigen. Guanin Nukleotid Dissoziations Inhibitoren (GDIs) können an Rho-GTPasen binden, so dass sie im inaktiven Zustand bleiben bis der Zyklus durch GEF-induzierte Aktivierung aufs Neue beginnt [9, 21, 23]. Wodurch die GEFs reguliert werden ist noch weitgehend unbekannt [23]. Zusätzlich zum Austausch von GDP gegen GTP benötigen die meisten Rho/Rac Proteine noch eine Bindung an die Plasmamembran, um ihre biologischen Funktionen erfüllen zu können [9]. Diese Bindung erfolgt über eine kovalent gebundene Lipidgruppe. Auch die Aktivierung der meisten Effektorproteine bedarf deren Membranlokalisation [9].

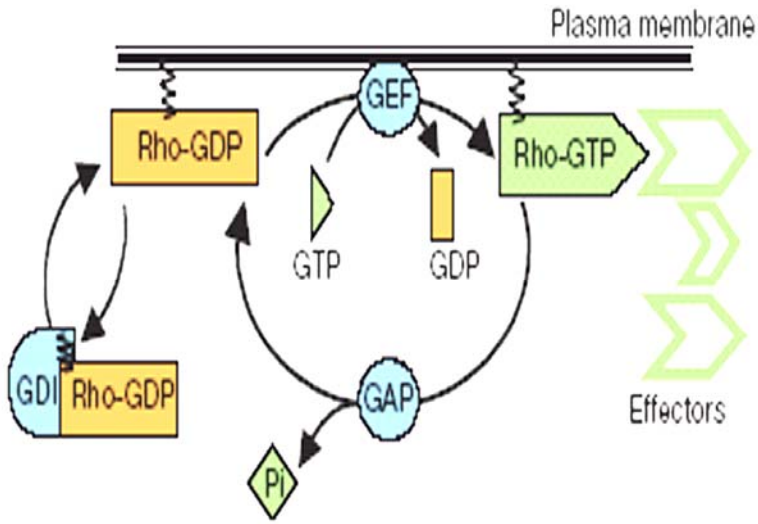


Abbildung 4: Schema der Rho-Aktivierung. Rho-GTPasen haben die Funktion von molekularen Schaltern, die zwischen einem aktiven, GTP-gebundenem und einem inaktiv, GDP-gebundenem Zustand wechseln können. GEF = Guanin Nukleotid Austausch Faktor, GAP = GTPase-aktivierendes Protein, GDI = Guanin Nukleotid Dissoziations Inhibitor. Abbildung verändert nach Etienne-Manneville et al. [16]. (Rho= *ras homolog*)

Aktive Rho-GTPAsen können mit einer Vielzahl von Effektorproteinen interagieren und auf diese Weise viele *downstream* gelegene Signalwege beeinflussen. Dies dient der Koordination verschiedener zellulärer Funktionen. Hierunter fallen die Umgestaltung des Aktin-Cytoskeletts, Proliferation und Differenzierung von Zellen, Zellpolarität, Migration und Apoptose [9, 23]. Die biologischen Veränderungen werden entweder direkt über die Regulation des Aktin-Cytoskeletts induziert, oder indirekt über eine Veränderung der Genexpression. Hierunter fällt die Aktivierung

von Transkriptionsfaktoren wie SRF *(serum response factor*), oder NFκB (*nuclear transcription factor-kB*) [7, 23]. Hierbei führen Veränderungen des Gleichgewichts zwischen der Cdc42- und Rac-Aktivität einerseits und der von Rho andererseits zu einer Umgestaltung des Aktin-Cytoskeletts, sowie zu einer Abnahme von E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakten.

Eine Aktivierung von Rho führt über eine Bündelung von Aktin- und Myosin-II-Filamenten zu so genannten Stressfasern. Gleichzeitig erfolgt einer Zusammenlagerung von Integrinen mit Hilfsproteinen, was die Ausbildung fokaler Kontakte hervorruft [16, 23]. RhoA ruft eine erhöhte Kontraktilität für die ganze Zelle hervor [3]. Der Aktivitätszustand von Rho wird äußerst genau kontrolliert. So enthält das menschliche Genom über 60 Aktivatoren und mehr als 70 Inaktivatoren [16]. Die Aktivierung von Rac bewirkt die Formation von Membranfalten und Lamellopodien. Dabei handelt es sich um Ausstülpungen der Plasmamembran, die ein Maschenwerk aus Aktin-Filamenten enthalten [16, 23]. Sie haben eine wichtige Funktion für die Zellmigration. Rac ist außerdem an der Endocytose von E-Cadherin beteiligt.

Die Überexpression von $p120^{ctn}$ induziert eine dramatische Veränderung der Zellmorphologie, bei der ein so genannter *branching*-Phänotyp entsteht. Der *branching*-Phänotp ist gekennzeichnet durch langen Zellausläufer und Lamellopodien, wodurch die Zellen ein Dendriten-ähnliches Aussehen annehmen. Diese Veränderungen stehen in Zusammenhang mit der Inhibierung von RhoA durch $p120^{ctn}$ [2, 25]. $p120^{ctn}$ kann nur mit Rho-GTPasen interagieren, wenn es cytoplasmatisch vorliegt. Dort kommt es aufgrund der Interaktion zu einer erniedrigten RhoA-Aktivität sowie zu einer gesteigerten Aktivität von Rac1 und Cdc42, was eine erhöhte Motilität der Zellen zur Folge hat [25, 36, 59]. $p120^{ctn}$ kann darüber hinaus den *crosstalk* zwischen Rac- und Rho-Siganltransduktionswegen kontrollieren, indem es die Lokalisation des GAP p190Rho reguliert [35, 59]. Das erklärt auch, weshalb Zellen, die vor allem cytoplasmatisches $p120^{ctn}$ aufweisen, einen *branching*-Phänotyp ausbilden und eine gesteigerte Motilität aufweisen. Hier sind sowohl Cadherin-defizienten Zellen, als auch $p120^{ctn}$-überexpremierende Zellen zu nennen [5]. In beiden Fällen erhöht cytoplasmatisches $p120^{ctn}$ durch seine Interaktion mit Rho-GTPasen die metastatische Potenz von Tumoren. $p120^{ctn}$ hat selbst keine GEF- oder GAP-

Aktivität, inhibiert RhoA GTPasen aber vergleichbar mit GDIs, indem es bevorzugt an GDP-gebundenes RhoA bindet und damit den GDP/GTP-Austausch verhindert [25, 43]. Hierbei kann p120^{ctn} entweder an Cadherine oder an Rho binden. Liegt p120^{ctn} an Cadherine gebunden vor, steht es für die Inhibierung von Rho nicht mehr zu Verfügung und die GTPase kann aktiviert werden [2, 25].

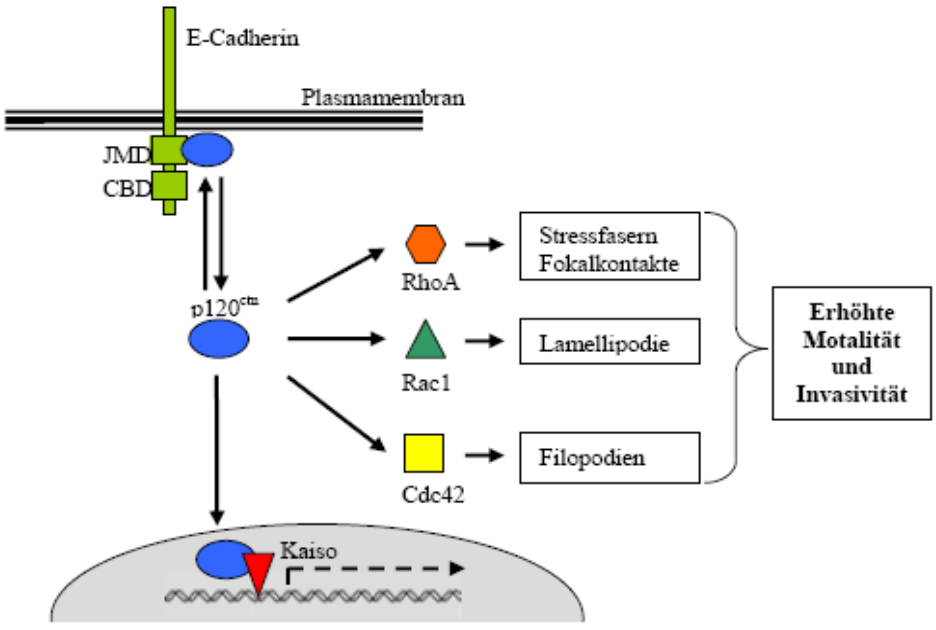


Schaubild 5: Übersicht der duch p120^{ctn}-vermittelten Einflüsse auf Rho GTPasen. Abbildung verändert nach Reynolds et al. [43]. (JMD=Juxtamembrane Domäne, CBD=Catenin-bindende Domäne, RhoA=*ras homolog A*, Rac1=*ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, Cdc42=*Cell division cicle 42*)

Die Bindung von p120^{ctn} an RhoA erfolgt über die N-terminal gelegene Regulatordomäne von p120^{ctn} und wird durch Phosphorylierung des Moleküls an Tyrosin-Resten reguliert [10]. Die Interaktion der beiden Proteine könnte dazu dienen, die Aktivität von Rho-GTPasen sowohl räumlich als auch zeitlich präzise zu kontrollieren und somit sicherzustellen, dass eine Aktivierung zur richtigen Zeit und am richtigen Ort erfolgt [25].

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von $p120^{ctn}$ auf die Zell-Zell-Adhäsion in humanen Karzinom-Zelllinien. Mehrer Autoren konnten zeigen, dass $p120^{ctn}$ direkt die Stärke der E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion beeinflussen [28]. Des Weiteren ist bekannt, dass dieses Protein in verschiedenen Karzinomen ganz fehlt und dies eine schlechte Prognose und erhöhte metastatische Potenz nach sich zieht [5].

Über die Regulation von $p120^{ctn}$ selbst kann bislang nur wenig berichtet werden. Zunächst sollte deshalb in verschiedenen humanen epithelialen Tumorzelllinien analysiert werden, welchen Einfluss eine unterschiedliche Wachstumsdichte auf die zelluläre Verteilung von $p120^{ctn}$ hat. Unterschiede in der Zelldichte könnten eine Veränderung in der Stärke der Zell-Zell-Adhäsion bewirken und damit eine Tumorzellmigration beeinflussen. Das Vorliegen von Metastasen ist von entscheidender Bedeutung für die Prognose eines an Krebs erkrankten Menschen.

Von Interesse war darüber hinaus auch, welchen Effekt eine Veränderung des extrazellulären Calcium-Angebots auf die Verteilung von $p120^{ctn}$ hat. Hierzu sollte mit Hilfe einer Co-Immunpräzipitation analysiert werden, ob ein Wechsel der extrazellulären Calcium-Konzentration eine veränderte Zusammensetzung der Bestandteile des E-Cadherin-Catenin-Komplexes bewirkt. Darüber hinaus war die Phosphorylierung von $p120^{ctn}$ an verschiedenen Tyrosin-Resten Gegenstand von Untersuchungen, da die Phosphorylierung bekanntermaßen eine wichtige Regulationsmöglichkeit biochemischer Prozesse darstellt.

Die verschiedenen Ansätze sollen zu einem besseren Verständnis der Einflüsse von $p120^{ctn}$ auf die Funktion des E-Cadherin-Catenin-Komplexes in Bezug auf Tumorgenese und Metastasierung von Karzinomzellen beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

Durchlichtscanner	ScanMaker X6 Microtek, Hsinchu, Taiwan
Fluoreszenzmikroskop	DM RBE Leica-Microsystems, Wetzlar
Phasenkontrastmikroskop	Axiovert 25 Zeiss, Oberkochen
Photometer	SmartSpec 3000 BioRad, München
Software	analySIS 3.2 Olympus, Soft Imaging System, Münster Openlab 3.5.2 Improvision, Tübingen LSM Image Browser Zeiss, Oberkochen ImageQuant Molecular Dynamics, Krefeld

2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle verwendeten Chemikalien bei Merck, Sigma oder Roche Diagnostics in p.a. Qualität bestellt.

2.1.3 Proteaseinhibitoren

Aprotenin Stammlösung	1 mM in H_2O 5 µM Endkonzentration
Leupeptin Stammlösung	2,3 mM in H_2O 10 µM Endkonzentration
Pefabloc Stammlösung	100 mM in Ethanol 1 mM Endkonzentration
Pepstatin Stammlösung	0,5 mM in Methanol 5 µM Endkonzentration
STI Stammlösung	0,5 mM in H_2O 5 µM Endkonzentration
Na-Orthovanadat Stammlösung	100 mM in H_2O 2 mM Endkonzentration
NaF	500 mM in H_2O 5 mM Endkonzentration
ß-Glycerophosphat Stammlösung	100 mM in H_2O 25 mM Endkonzentration
Na-Pyrophosphat Stammlösung	100 mM in H_2O 10 mM Endkonzentration
Okadaic Acid Stammlösung	1 mM in H_2O 1 µM Endkonzentration
EDTA Stammlösung	0,5 M in H_2O 2 mM Endkonzentration
EGTA Stammlösung	0,5 M in H_2O 2 mM Endkonzentraion
Inhibitorenmix 100x	0,25 mg/ml PefaBloc 100 µg/ml STI 1,4 mg/ml Aprotenin 1 µg/ml Leupeptin in 50 mM Tris; pH 7,4

2.1.4 Erst-Antikörper

Tabelle 1: verwendete Erstantikörper

Antikörper gerichtet gegen	**aus Spezies**	**Verdünnung WB/IF**	**Hersteller** Bestellnummer
β-Aktin	Maus, mk	1:5000 1:500	Sigma A-5441
α-Catenin	Maus, mk	1:1000 1:50	BD Bioscience C21620
α-Catenin	Kanninchen, pk	1:5000 1:500	Sigma C2081
β-Catenin	Maus, mk	1:2000 1:50	BD Bioscience C19220
β-Catenin	Kanninchen, pk	1:5000 1:500	Sigma C2206
α-Tubulin	Maus, mk	1:15000 1:5000	Sigma T5168
$p120^{ctn}$	Maus, mk	1:1000 1:500	BD Bioscience 610134
$p120^{ctn}$	Kanninchen, pk	1:2000 1:100	Santa Cruz SC-1101
Cytokeratin 8/18	Maus, mk	1:2000	BD Bioscience 550508
E-Cadherin	Maus, mk	1:4000 1:200	BD Bioscience 610182
Phospho- $p120^{ctn}$ PY96	Maus, mk	1:1000	BD Bioscience 612535
Phospho-$p120^{ctn}$ PY228	Maus, mk	1:5000	BD Bioscience 612537
Phospho-$p120^{ctn}$ PY280	Maus, mk	1:250	BD Bioscience 612539
Phospho-$p120^{ctn}$ PY291	Maus, mk	1:500	BD Bioscience 612691
Phosphotyrosin PY20	Maus, mk	1:1000	BD Bioscience 610000

(mk = monoklonal, pk = polyklonal, WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz)

2.1.5 Zweit-Antikörper

Tabelle 2: verwendete Zweitantikörper

Antikörper gerichtet gegen	**aus Spezies**	**gekoppelt mit**	**Verdünnung WB/IF**	**Hersteller** Bestellnummer
Maus IgG	Ziege	Alkalische Phosphatase	1:5000 1:100	Sigma A-3562
Maus IgG	Ziege	Peroxidase	1:5000 1:100	Pierce A-4416
Maus IgG	Ziege	Cy3	1:5000 1:100	Dianova 111-165-003
Kanninchen IgG	Maus	Alkalische Phosphatase	1:5000 1:100	Dianova 211-055-109
Kanninchen IgG	Ziege	Peroxidase	1:5000 1:100	Sigma A-6154
Kanninchen IgG	Ziege	Peroxidase	1:5000 1:100	Pierce 31460
Kanninchen IgG	Ziege	Cy3	1:5000 1:100	Dianova 111-166-045
Kanninchen IgG	Ziege	Alexa 488	1:5000 1:100	Alexis Biochemicals A-11008

(IgG = ImmunglobulinG, WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz)

2.1.6 Verwendete Zelllinien

Tabelle 3: verwendeten Zelllinien

Zelllinie	**Gewebe**	**Spezies**	**Bezugsquelle**
BxPC-3	Pankreas Adenokarzinom	human	ATCC CRL-1687
MDA-MB 468	Mamma Adenokarzinom Gehirnmetastase	human	ATCC HTB-132
MCF-7	Mamma Adenokarzinom	human	ATCC HTB-22
PA-TU 8902	Pankreas Adenokarzinom	human	DSMZ ACC179

(ATCC = *American Type Culture Collection,* DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

2.2 Methoden

2.2.1 Medienwechsel

Die in Kultur gehaltenen Zellen sind darauf angewiesen, dass jeden zweiten oder dritten Tag ein Medienwechsel vorgenommen wird. Hierbei werden die z.T. toxischen Abfallprodukte des Zellstoffwechsels entfernt und den Zellen neue Nährstoffe zugeführt.

2.2.2 Umsetzen der Zellen

Die Zellen müssen bei einer Konfluenz von 80-100% in ein neues Gefäß umgesetzt werden, da sie sonst aufgrund der Kontaktinhibition ihr Wachstum einstellen werden.

Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml sterilem CMF-PBS gewaschen. Nach Entfernung des CMF-PBS wurde der Zellrasen mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert und unter mikroskopischer Kontrolle das Ablösen der Zellen abgewartet. Hierbei war darauf zu achten, dass die Zellen nicht länger als 10 min der Trypsin-Wirkung ausgesetzt waren, um sie nicht irreversibel zu schädigen. Das vorherige Waschen mit CMF-PBS diente der optimalen Wirkungsentfaltung des Trypsins, welches sonst durch das im Medium enthaltende FCS inhibiert werden würde. Nachdem sich der Zellrasen abgelöst hatte, wurde durch Zugabe von 5 ml Wachstumsmedium die Wirkung des Trypsins gestoppt. Hierbei wurden auch die restlichen, noch nicht vollständig abgelösten Zellen abgespült und alles in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte nun für drei Minuten die Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 200 x g. Der Überstand wurde entfernt und verworfen, während das Zell-Sediment in 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert wurde. Das Aussäen der Zellen richtete sich nach der Zelllinie und erfolgte mit einem Verdünnungsfaktor von 1:5 und 1:6.

Lösungen für die Zellkultur

CMF-PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM KH_2PO_2 10 mM Na_2HPO_4
Wachstumsmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium 10% fötales Kälberserum (FCS); hitzeinaktiviert 5 ml Glutamin 5 ml nicht-essentielle Aminosäuremix
Trypsin	Biochrom 0,05% Trypsin (w/v) 0,02% EDTA (w/v)

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierbei wurde die Zählkammer mit einer kleinen Menge Zellsuspension befüllt und 4 Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Zur Feststellung der Zellzahl pro Milliliter wurde der Mittelwert aus den 4 Großquadraten mit dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert. Das Volumen über den Großquadraten ist mit 0,1 µl zu veranschlagen.

2.2.4 Aussäen der Zellen

Um den Einfluss einer unterschiedlichen Wachstumsdichte auf den Gehalt an E-Cadherin und Cateninen zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst mit einer Konfluenz von 60% Prozent ausgesät (2 x 10^5 Zellen in 60 mm^2). Am nächsten Tag wurden die ersten Zellkulturschalen mit dem NOP-Lysispuffer aufgearbeitet. Sie hatten zu diesem Zeitpunkt eine Konfluenz von circa 70% erreicht und waren somit subkonfluent. Am darauf folgenden Tag wurden die nächsten Schalen mit einer Konfluenz von 80% bis 90% aufgearbeitet (konfluente Lysate). Am dritten Tag wurden die letzten Schalen verarbeitet. Sie hatten eine Konfluenz von nahezu 100% erreicht (superkonfluente Lysate).

2.2.5 Zellen ohne Calcium

Um den Posphorylierungsgrad bestimmter Proteine und Proteinbestandteile zu untersuchen, wurden Zellen mit einer Konfluenz von 60% in Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und durch ein calciumfreies ersetzt. Der Entzug von Calcium hebt die homophile Wechselwirkung von Cadherinen gegenüberliegender Zellen auf und führt zu einer Inaktivierung der Adhäsionsfunktion.

Am darauf folgenden Tag wurde dieses Medium entfernt und durch DMEM oder Wachstumsmedium (DMEM + FCS) ersetzt. Damit wurden die Zellen für Zeiträume zwischen 30 Minuten und 4 Stunden bei 37^0 C und 10% CO_2 inkubiert bevor sie aufgearbeitet wurden. In einem Teil der Zellkulturschalen wurde das calciumfreie Medium als spätere Kontrolle belassen. Alternativ wurde dieses Medium mit dem Wachstumsfaktor *EGF* in einer Verdünnung von 1:5.000 versetzt. Die Zellen wurden damit für 10 min bei 37^0 C und 10% CO_2 inkubiert, bevor sie aufgearbeitet wurden. Durch Zugabe dieser beiden Medien formiert sich der Adhäsionskomplex neu. Ist nun eine Phosophorylierung bestimmter Proteine nachweisbar, kann eine Aussage über den Zusammenhang zwischen dieser Phosphorylierung und Calcium bzw. den zusätzlichen Faktoren im Wachstumsmedium, getroffen werden. Des Weiteren ist es möglich die Bedeutung von Calcium für die Bildung des Adhesionskomplexes zu untersuchen. *EGF* diente als Kontrolle, da es Phosphorylierung induziert.

EGF human	Roche Diagnostics, Mannheim 11376454001

2.2.6 Aushungern von Zellen

Um die Phosphorylierung bestimmter Proteine und Proteinbestandteile in Abhängigkeit einer unterschiedlichen Wachstumsdichte (Konfluenz) zu untersuchen, wurden zunächst Zellen unterschiedlich dicht ausgesät.

Tabelle 4: Aushungern von Zellen

Bezeichnung	Zellzahl	Wachstumsfläche	Medienvolumen
subkonfluent	2 x 10^5	60 mm^2	2,0 ml
Konfluent/ superkonfluent	2,8 x 10^5	60 mm^2	2,0 ml

Die subkonfluent-ausgesäten Zellen wurden 24 Stunden nach den konfluent bzw. superkonfluenten Zellen ausgesät. Nachdem sich die Zellen abgeheftet hatten, wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und durch DMEM ersetzt. Dies dient der Synchronisation, sowie der Differenzierung der Zellen. Nach 12 Stunden wurden die Zellen mit 0,5% H_2O_2 plus OV (Orthovanadat) in einer Verdünnung von 1:10 für eine Stunde inkubiert.

Orthovanadat ist ein Analogon des Phosphat-Ions und ein Inhibitor von Tyrosin-Phosphatasen. Durch Zugabe von Orthovanadat wird die Abnahme der Tyrosin-Phosphorylierung verlangsamt, so dass sie messbar wird. H_2O_2 wird benötigt um Na^+-Vanadat durch Oxidation in Orthovanadat zu überführen, da es nur in dieser Form als Tyrosin-Phosphatasen-Inhibitor wirksam ist. Es war darauf zu achten, dass die Zellen nicht zu lange mit H_2O_2 inkubierten, da es zelltoxisch ist. Anschließend wurden alle Zellkulturschalen mit dem RIPA-Lysispuffer und zusätzlichen Proteinaseinhibitoren aufgearbeitet.

2.2.7 Zellen mit Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1

Um den Einfluss einer Inhibition von Rho- und Rac-GTPasen auf den zellulären Cadherin- und Catenin-Gehalt zu messen, wurden diese GTPasen durch spezifische Inhibitoren in ihrer Aktivität gehemmt. Zunächst wurden 2,5 x 10^5 Zellen in 60 mm Schalen ausgesät, die am nächsten Tag eine Konfluenz von 80% erreicht hatten. Nun wurde ein Medienwechsel vorgenommen, um alle Zellen zu synchronisieren und gleiche Bedingungen zu erzielen. Nach einer Stunde wurden der Rho-Kinase-Inhibitor (ROCK-Inhibitor), sowie der Rac1-Inhibitor hinzugegeben. Die Zellen wurden mit diesen Inhibitoren zwischen 30 Minuten und 2 Tagen inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben.

Rho-Kinase-Inhibitor	1:500 688000	Calbiochem, Bad Soden
Rac-Inhibitor	1:1000 553502	Calbiochem, Bad Soden

2.2.8 Herstellung von Proteinlysaten

Bei der Herstellung von Proteinlysaten ist es wichtig, dass die Proteine auch nach der Aufarbeitung in ihrer nativen Form vorliegen. Um das zu erreichen, wurden isotonische Lösungen mit neutralem pH verwendet und alle Arbeitsschritte zügig und auf Eis ausgeführt. Die Verwendung von Proteaseinhibitoren sollte den Abbau der Proteine durch zelleigne Proteasen verhindern. Zunächst wurden die Zellen mit eisgekühltem CMF-PBS- oder TBST-Puffer gewaschen, bevor der mit Proteaseinhibitoren versetzte NOP- oder RIPA-Lysispuffer hinzugegeben wurde. Die verschiedenen Lysispuffer unterschieden sich durch den Gehalt und die Stärke der jeweiligen Bestandteile. Stehen bei einer Proteinaufarbeitung Proteinkomplexe im Vordergrund, wurde der NOP-Lysispuffer verwendet. Er enthält nur schwache Detergenzien und ist somit schonender für die Proteine. Der RIPA-Puffer wurde eingesetzt, wenn durch die Aufarbeitung einzelne Proteine untersucht werden sollten.

Die Zellen wurden nach kurzer Einwirkzeit des Puffers mit einem Zellschaber abgekratzt und mit Hilfe eines Dounce-Glashomogenisators oder einer dünnen Injektionsnadel zerlegt. Die homogenisierten Zellen wurden nun in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 4^0 C und 13.000 x g zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde verworfen, während der Überstand mit dem Proteinlysat in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80^0 C aufbewahrt wurde.

TBST

10 mM Tris-HCl; pH 7,4
150 mM NaCl
0,2% Tween-20

Lysis-Puffer

RIPA	50 mM Tris-HCL; pH 7,2 150 mM NaCl 10 mM EDTA 10 mM EGTA 1% Triton X-100 (v/v) 1% Na-Deoxycholat (w/v) 0,1% SDS (w/v) Inhibitorenmix 1:50
NOP	10 mM Tris-HCL; pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM EDTA 2 mM EGTA 0,2% Triton X-100 (v/v) 1% Igepal (NP40) (v/v) Inhibitorenmix 1:50 (Inhibitorenmix siehe unter Material 2.1.3

2.2.9 Aufarbeitung mit Triton X-100-enthaltenden Lysispuffer

Die Aufarbeitung mit einem Triton X-100-enthaltenden Lysispuffer führt zur Entstehung von zwei Fraktionen. In der einen befinden sich die Proteine, welche mit dem Aktin-Cytoskelett der Zelle assoziiert sind (Triton X-100-unlösliche Fraktion) und in der anderen die, die sich im Cytosol oder in der Zellmembran befinden (Triton X-100-lösliche Fraktion).

Nach dem Waschen der Zellen mit eisgekühltem CMF-PBS wurden die Zellen mit Triton X-100-enthaltendem Lysis-Puffer, der auch mit Proteaseinhibitoren angereichert war, behandelt. Die Zellen wurden damit für 10 Minuten bei 4^0 C schüttelnd inkubiert, bevor sie mit dem Zellschaber von ihren Kulturschalen entfernt und ohne vorheriges Homogenisieren für 10 Minuten bei 4^0 C mit 13.000 x g zentrifugiert wurden. Der dabei entstandene Überstand enthielt die Triton X-100-lösliche Fraktion, während das Sediment die Triton X-100-unlösliche Fraktion entielt. Das Sediment wurde mit RIPA-Puffer versetzt, mit einer dünnen Injektionsnadel zerkleinert und für 10 Minuten bei 4^0 C mit 13.000 x g zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben und bei -80^o C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Triton-Puffer
KRH-Puffer
1 M CaCL2
0,5 M EGTA
0,5 M EDTA
10% Triton X-100 (v/v)
0,3 M Saccharose
Inhibitorenmix 1:50

KRH-Puffer (Krebs-Ringer-Hepes-Puffer)
250 mM HEPES
(N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)
1,04 M NaCl
50 mM KCl
10 mM KH_2PO_2
12 mM $MgSO_4$

2.2.10 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde Bicinchoninsäure (BCA) verwendet. Hierbei werden Cu^{2+}-Ionen, die mit Proteinen in einer alkalischen Lösung einen Komplex bilden, zu Cu^{+}-Ionen reduziert. Diese Cu^{+}-Ionen bilden gemeinsam mit BCA einen violetten Farbkomplex, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann. So ist ein sensitiver Proteinnachweis beim Absorbtionsmaximum des Komplexes möglich. Um die Proteinkonzentrationen zu bestimmen, wurden jeweils 5 µl Lysat mit 45 µl H_2O verdünnt und mit 1 ml Färbereagenz versetzt. Dieses Färbereagenz bestand aus 50 Volumenanteilen BCA-Lösung und einem Volumenanteil 4% $CuSO_4$-Lösung. Als Kalibrierstandard für den Konzentrationsbereich 0 – 100 µg diente Rinderserumalbumin (BSA). Das Gemisch wurde für 20 Minuten bei 37^0 C inkubiert, bevor es in Küvetten überführt und photometrisch gemessen wurde. Nach mathematischer Berechnung ergab sich die jeweilige Proteinkonzentration.

2.2.11 Co-Immunpräzipitation

Bei der Co-Immunpräzipitation (IP) werden mithilfe von Antikörpern spezifisch Proteine aus einem Gesamtproteinlysat isoliert. Der verwendete Antikörper, gekoppelt an eine Trägersubstanz, bildet hierbei einen Komplex mit seinem entsprechenden Protein (Antigen). Als Trägersubstanz wurde Protein-A-Affinitätsgel verwendet. Hierbei handelt es sich um einen IgG-Rezeptor, der aus

dem Bakterium Staphylokokkus aureus isoliert wird und Immunglobuline an ihrem Fc-Ende binden kann. Bindet der Antikörper über Antigen-Antikörper-Reaktionen an das gesuchte Protein entstehen Präzipitate, die aus der Gesamtlösung eluiert werden können. Zusätzlich zu diesem Protein werden auch diejenigen Proteine präzipitiert, die mit dem Hauptprotein verbunden sind und einen Komplex mit diesem bildeten. Die Co-IP dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Das verwendete Gesamtlysat sollte zu diesem Zweck mit dem NPO-Puffer aufgearbeitet worden sein, um die Protein-Komplexe nicht zu zerstören.

Für die Co-IP wurden zunächst 20 µl Protein-A-Affinitätsgeld und 500 µl IP-Puffer in Reaktionsgefäße vorgelegt, bevor 3 µl des entsprechenden Antikörpers hinzu gegeben wurden. Ein Reaktionsgefäß enthielt 3 µl eines unspezifischen Antikörpers, um die Spezifität des Präzipitations-Antikörpers nachzuweisen. Die Reaktionsgefäße wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur kopfüber rotierend vorinkubiert, um die Bindung des Antikörpers an das Protein-A-Affinitätsgel zu ermöglichen. Nun wurden die Reaktionsgefäße für eine Minute bei 5.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbliebene Gemisch wurde mit gleichen Mengen Proteinlysat (300 - 500 µg) versetzt und mit IP-Puffer auf 500 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 2 Stunden bei 4^{o} C kopfüber rotierend inkubiert, damit die Bindung des Antikörpers an das gesuchte Protein erfolgen konnte. Nach zwei Stunden wurden die Gemische fünfmal bei 2.000 x g und 4^{o} C mit je 500 µl IP-Waschpuffer gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Danach wurde das Sediment in 25 µl Lämmli-Probenpuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 95^{o} C aufgekocht. Das Aufkochen diente der Denaturierung der präzipitierten Proteine, sowie der Trennung der extrahierten Proteine vom Protein-A-Affinitätsgel und der Dissoziation des Proteins von seinem Antikörper. Der Nachweis des präzipitierten Porteins und seiner co-präzipitierten Interaktionspartner erfolgte durch Western Blot.

IP-Puffer (2 x)	20 mM Tris-HCl, pH 7,4 300 mM NaCl 10% Triton X-100 1% NP40 1:50 Inhibitorenmix

IP-Waschpuffer 20 mM Tris
800 mM NaCl
1% Triton X-100
1% NP40
0,2% Na-Deoxycholat
1:50 Inhibitorenmix

Unspezifischer Antikörper
Rabbit-anti-Maus-IgG 315-001-003
Dianova, Hamburg

2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen in einem Gesamtprotein-Gemisch wurde mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erreicht, die auf der Bewegung von Proteine in einem elektrischen Feld beruht. Als Trennmedium dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis, das über Bisacrylamid quervernetzt wird. Zusätzlich kommt SDS zum Einsatz. Dieses anionische Detergenz denaturiert Proteine und verhindert dadurch Protein-Protein-Wechselwirkungen. Zudem überdeckt es die Eigenladung der Proteine, so dass alle Proteine als negativ geladene Moleküle vorliegen. Die Auftrennung erfolgt nur nach dem unterschiedlichen Molekulargewicht der Proteine und nicht aufgrund unterschiedlicher Ladungen. Zunächst wurden die Lysate mit Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95^{o} C aufgekocht, um eventuell noch vorhandener Sekundärstrukturen aufzulösen.

PAGE-Laufpuffer

0,05 M Tris
0,15 M Glycin
0,1% SDS (x/v)
pH nicht eingestellt

Proteinprobenpuffer, verändert nach Lämmli (4x)

2% SDS (w/v)
10% Glycerin (v/v)
5% Mercaptoethanol (v/v)
0,2% Bromphenolblau (w/v)

Aufbau des Trenngels (10%)

3 M Tris, pH 8,8%	600 µl
10% SDS	48 µl
H_2O	1,9 ml
30% Acrylamid	1,6 ml
2% Bisacrylamid	650 ml
TEMED	2 µl
APS	30 µl

Aufbau des Sammelgels (7,5%)

1 M Tris, pH 6,8	380 µl
60% Saccharose	750 µl
10% SDS	30 µl
H_2O	1,3 ml
30% Acrylamid	380 µl
2% Bisacrylamid	150 ml
TEMED	5 µl
APS	30 µl

Das Molekulargewicht der einzelnen Banden konnte anhand eines zusätzlich aufgetragenen Molekulargewicht-Größenstandards bestimmt werden. Die Elektrophorese im Sammelgel erfolgte bei 80 V und wurde nach Erreichen des Trenngels auf 140 V gesteigert. Die Acrylamidgele wurden später auf Nitrocellulose-Membranen geblottet oder mit Coomassieblau-Lösung angefärbt.

Größenstandards

Page Ruler Prestained Protein Ladder
Fermentas, St. Leon-Rot
kDa: 170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, 17, 11

Prestained SDS Molecular Weight Markers
Sigma, Taufkirchen
kDa: 185, 11, 84, 61,5, 55, 36, 31

Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range
Biorad Laboratories, München
kDa: 111, 73, 48, 43, 29

2.2.13 Coomassie-Blau-Färbung

Die Coomassie-Blau-Färbung dient der Qualitätsbeurteilung der angefertigten Proteinlysate. Im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden

die Gele für einige Stunden in einer Coomassie-Blau-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie mit einer entsprechenden Entfärbelösung so weit entfärbt wurden, dass nur die Proteinbanden und kein unspezifischer Hintergrund sichtbar waren. Die Gele konnten nun zur Archivierung zwischen Zellophanfolie gespannt werden.

Coomassieblau	0,025% Coomassie brilliant blue (w/v) 10% Essigsäure (v/v) 25% Isopropanol (v/v)
Entfärbelösung	10% Essigsäure (v/v) 12,5% Isopropanol (v/v)

2.2.14 Western Blot

Nachdem die Proteine durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt worden waren, erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran in einer Tank-Blot-Apparatur. Hierbei bewegen sich negativ geladenen Proteine entlang eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes in Richtung Anode.

Aufbau des Western Blots

Anodengitter, drei Schwämme, ein dünnes Filterpapier, in H_2O gewaschene Nitrocellulose-Membran, Gel, ein dünnes Filterpapier, drei Schwämme, Kathodengitter.

Sowohl die Filterpapiere, als auch das Gel wurden zuvor für wenige Minuten in Transferpuffer inkubiert. Beim Aufbau der einzelnen Komponenten war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bildeten. Nachdem die Blotkammer mit Transferpuffer befüllt worden war, erfolgte der Transfer bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren. Die Blotdauer und die verwendete Stromspannung richtete sich nach den zu untersuchenden Proteinen. Bei einer Blotdauer von 3 Stunden betrug die Spannung 60 V; bei 12 Stunden 20 V.

Nitrocellulose-Membran	Whatmann, Brentford, Großbritannien

Transferpuffer	25 mM Tris 1,5% Glycin (w/v) 20% Methanol 0,1% SDS

2.2.15 Semidry Blotting

Eine weitere Möglichkeit des Proteintransfers ist das Semidry-Blotting. Dieses Verfahren hat sich als deutlich effizienter erwiesen, wenn der Phosphorylierungsgrad bestimmter Proteine und Proteinbestandteile untersucht werden soll.

Aufbau des Semidry Blots

Anode (untere Graphit-Platte, gut befeuchtet mit Puffer 1), eine Lage Filterpapier (gewaschen in Puffer 1), zwei Lagen Filterpapier (gewaschen in Puffer 2), in H_2O gewaschene Nitrocellulose-Membran, Gel (15 Minuten gewaschen in Kathodenpuffer), drei Lagen Filterpapier (gewaschen mit Puffer 3), Kathode (obere Graphit-Platte, gut befeuchtet mit Puffer 3).

Die Blotdauer betrug eine Stunde und 30 Minuten. Die erforderliche Stromstärke berechnete sich aus Größe des Blottes in cm^2 multipliziert mit 2,5 mA. Die Spannung wurde auf 80 V begrenzt. Während des Blotting-Vorgangs wurde die Blotting-Kammer mit ausreichend Eis gekühlt.

Transferpuffer	
Puffer 1	300 mM Tris (pH 10,4) 20% Methanol
Puffer 2	30 mM Tris (pH 10,2) 20% Methanol
Puffer 3	25 mM Tris (pH 9,2) 20% Methanol 40 mM 6-Aminocarponsäure

2.2.15 Ponceaurot-Färbung

Im Anschluss an den Immunblot wurden die Membranen mit einer Ponceaurot-Lösung gefärbt, um die Qualität und Vollständigkeit des Proteintransfers beurteilen zu können. Die Blots wurden hierfür für einige Minuten in der Ponceaurot-Lösung inkubiert, bis die Proteinbanden gleichmäßig angefärbt und erkennbar waren. Für den anschließenden immunologischen Proteinnachweis wurden die Banden der Größenstandards nachgezeichnet. Danach wurden die Membranen mit CMF-PBS vollständig entfärbt.

Ponceaurot	0,15% Ponceau S (w/v) 5% Essigsäure (v/v)

2.2.16 Immunfärbung

Die durch den Immunblot auf eine Nitrocellulose-Membran überführten Proteine können immunologisch durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Der spezifische Antikörper bindet an das passende Protein (Antigen) auf der Membran und wird dann durch einen Zweitantikörper gebunden. Dieser Zweitantikörper ist spezifisch gegen den Erstantikörper gerichtet und an die Enzyme Peroxidase (hrp – *horse radish peroxidase*) oder alkalische Phosphatase gekoppelt. Diese Enzyme setzen ein Substrat um, was die Messung der Antigen-Antikörper-Reaktion ermöglicht. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol: durch Chemolumineszenz kann ein Röntgenfilm belichtet und dadurch das Protein sichtbar gemacht werden. Bei der alkalische Phosphatase Reaktion (AP) erfolgt der Proteinnachweis durch eine Farbreaktion, die durch hydrolytische Spaltung des Substrats 5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat (BCIP) zustande kommt. BCIP wird in Verbindung mit Nitorblau-Tetrazolium (NBT) als Farbverstärker verwendet. Die Detektion mit Peroxidase ist etwa 10fach sensitiver als der Proteinnachweis mittels alkalischer Phosphatase.

Zunächst mussten die freien Bindungsstellen der NitrocelluloseMmbran zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen abgesättigt werden. Hierzu wurde BSA in CMF-PBS gelöst und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Konzentration der BSA-CMF-PBS-Lösung betrug 3%. Nun wurden die Erstantikörper in entsprechender Verdünnung (Tabelle 1) auf die Blots gegeben. Die Inkubationszeit richtete sich nach der eingesetzten Proteinmenge, sowie der Aktivität des Antikörpers und betrug zwischen 4 und 12 Stunden. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur (Verdünnung siehe Tabelle 2). Vor und nach den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Membranen 3 Mal für 10 Minuten mit CMF-PBS gewaschen, um schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Antikörper wurden in 0,3% BSA enthaltendem CMF-PBS verdünnt.

Um den Phosphorylierungsgrad bestimmter Proteine zu untersuchen wurde BSA in Konzentrationen von 2% bis 5% in TBST gelöst die und Nitrocellulose-Membran für eine Stunde inkubiert. Die phosphospezifischen Erstantikörper wurden in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 1) für 6 bis 12 Stunden mit den Blots inkubiert. Sie wurden in TBST, welches mit 2% Blockingreagenz oder 0,3% BSA versetzt war, gelöst. Die Zweitantikörper wurden in TBST, versetzt mit 2% Blockingreagenz, 0,3% BSA oder 3% Milch angesetzt. Zwischen den Antikörper-Inkubationszeiten wurden die Blots jeweils 3 Mal für 10 Minuten mit TBST, versetzt mit 0,5% oder 2,0% BSA, gewaschen.

Blockingreagenz	ECL Advance blocking agent, Amersham Bioscience Großbritannien

Sollte der Nachweis der an Antikörper gebundenen Proteine mittels Peroxidase erfolgen, mussten die Blots zunächst für 5 Minuten in der ECL-Lösung (*Enhanced Chemoluminescence*) inkubiert werden. Anschließend wurden sie in eine lichtundurchlässige Kassette gegeben, mit einer Folie faltenfrei abgedeckt und mit einem AGFA-Röntgenfilm bedeckt. Die Expositionszeit richtete sich nach der Stärke des Signals und variierte zwischen wenigen Sekunden und 30 Minuten.
Zur Vorbereitung der Detektion mittels alkalischer Phosphatase Reaktion wurden die Membranen im letzten Waschschritt für 10 Minuten in AP-Puffer gewaschen, bevor sie abgedunkelt mit der AP-Färbelösung inkubiert wurden. Sobald eine gut sichtbare Bande erschien, wurde die Reaktion mit Wasser zum Stillstand gebracht und die Blots gescannt.

ECL-Lösung	Western Blot Detection Regent 1 und 2 Pierce, Bonn Verhältnis 1:1
AP-Färbelösung	NBT und BCIP Verdünnung 1:15 mit AP-Puffer
AP-Puffer	50 mM Tris-HCL (pH 9,4) 50 mM $MgCl_2$
NBT	10 mg NBT in 1 ml H_2O
BCIP	10 mg BCIP in 1 ml H_2O

2.2.17 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfäbrung (IF) dient der Detektion bestimmter Proteine innerhalb einer Zelle. Man kann so die Lokalisation von Proteinen sichtbar machen und sie in den Kontext anderer zellulärer Strukturen stellen. Hierfür verwendet man Zweitantikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind.

Zunächst wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Hatten sie eine Konfluenz zwischen 70% - 80% erreicht, wurde das Wachstumsnedium abgesaugt, die Zellen mit CMF-PBS plus 2 mM Ca^{2+} gewaschen und anschließend fixiert. Die Fixierung richtete sich nach dem nachzuweisenden Proteine und erfolgt entweder mit einem -20^0 C kaltem 1:1 Gemisch aus Aceton und Methanol, oder mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in CMF-PBS. Bei beiden Fixierungsarten wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor ein Waschschritt mit CMF-PBS erfolgte.

Bei der Fixierung mit PFA war eine Permeabilisierung mit 0,2% Triton X-100 in PBS erforderlich, um dem Antikörper das Eindringen in die Zelle zu ermöglichen. Unspezifische Bindungen wurden mit 3% BSA in CMF-PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach wurde der Erstantikörper in 0,3% BSA in CMF-PBS gelöst und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Erstantikörper gründlich abgesaugt. Nachdem die Zellen mit CMF-PBS gewaschen worden waren, wurden sie für eine Stunde mit dem in 0,3% BSA in

CMF-PBS gelösten Zweitantikörper bedeckt und für eine Stunde in eine abgedunkelten Kammer gegeben. Dieser Zweitantikörper war spezifisch gegen den ersten gerichtet und zusätzlich mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Nun erfolgte dreimaliges Waschen, mit destilliertem Wasser, um ein Auskristallisieren von Salzen beim Trocknen zu verhindern. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Elvanol auf Objektträgern fixiert. Die so angefärbten Proteine konnten dann unter einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet und fotografiert werden.

Elvanol	15% Mowiol (w/v) 1% NaN_3 (w/v) 30% Glycerin in PBS (pH 7,3)

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der E-Cadherin-p120^{ctn}-Interaktion in epithelialen Zelllinien

Die Fragestellung wurde mit Hilfe von vier epithelialen Zelllinien bearbeitet, von denen zwei Brustkarzinom-Zelllinien waren: MCF-7 und MDA-MB-468 und zwei Pankreaskarzinom-Zelllinien: PA-TU 8902 und BxPc3 In der folgenden Abbildung sind die verwendeten Zelllinien abgebildet.

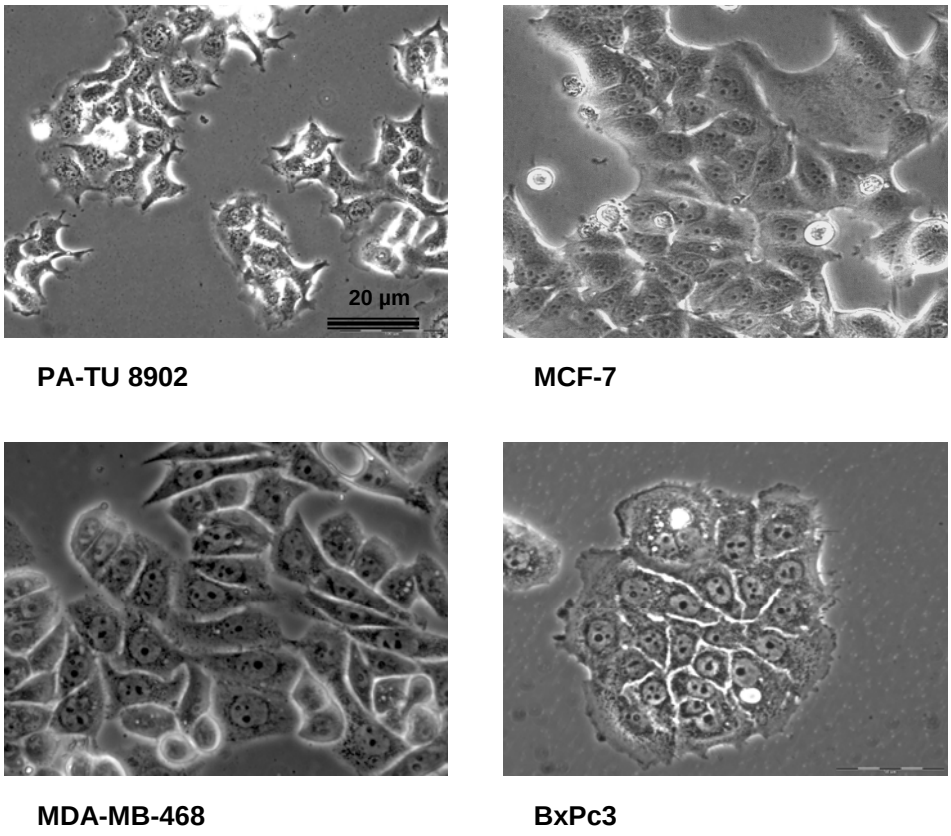


Abbildung 6: Phasenkontrast-Abbildung der verwendeten Zelllinien MCF-7, PA-TU 8902, MDA-MB-468 und BxPc3. Darstellung subkonfluent gewachsener Zellen. MCF-7 und MDA-MB-468 Zellen stammen aus Mammakarzinomen, PA-TU8902 und BxPc3 aus Pankreaskarzinomen.

Alle Zellen zeigen in der Phasenkontrastdarstellung einen epithelialen Charakter. Dieser ist unter anderem gekennzeichnet durch Kolonien nahezu lückenlos aneinander liegende Zellen, sowie deren regelmäßige Zellform. Bei den BxPc3 Zellen war die deutlichste epitheliale Differenzierung zu erkennen: Sie wuchsen

regelmäßiger, als die anderen abgebildeten Zellen, bildeten eine klar umschriebene Kolonie und zeigten eine regelmäßige Struktur. Die MCF-7 Zellen erscheinen dahingegen undifferenzierter und in ihrem Wachstum weniger geordnet. PA-TU 8902 Zellen bildeten kleinere Kolonien und zeichneten sich durch Zellen mit spitzen Zellausläufern und kleinen Zellkernen aus. MDA-MB-468 Zellen waren undifferenzierter und weniger epithelial, als die anderen Zelllinien. Sie wuchsen unstrukturiert, wiesen unterschiedliche Zellgrößen, sowie eine gering ausgeprägte Polarisation auf.

Zunächst wurde in allen verwendeten Zelllinien E-Cadherin und $p120^{ctn}$ mit Hilfe von Western Blots nachgewiesen (Abbildung 7). Bei den beiden Brustkrebs-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 ergaben sich stärkere Banden für E-Cadherin, als bei den beiden Zelllinien aus dem Pankreaskarzinom. Hierbei zeigte sich bei den PA-TU 8902 Zellen ein deutlich schwächeres Signal, als bei den BxPc3 Zellen. Anders verhielt es sich bei $p120^{ctn}$. Dieses Protein ergab eine starke Bande in den PA-TU 8902 und den BxPc3 Zellen. Ein etwas schwächeres Signal war in den MCF-7 Zellen zu beobachten, während in den MDA-MB 468 Zellen nur sehr geringe Mengen nachweisbar waren. Anhand der Bandenintensität können Rückschlüsse auf die Konzentration der Proteine getroffen werden. Als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Gele diente jeweils der Nachweis von β-Aktin. Die Konzentration dieses Proteins ist in den Zellen relativ konstant, so dass es die Überprüfung einer einheitlichen Proteinbeladung der Gele ermöglicht.

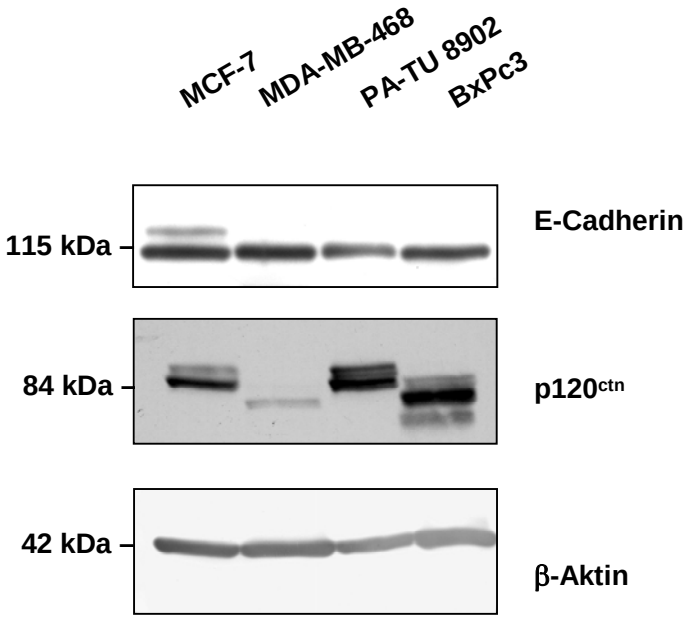


Abbildung 7: Gehalt von E-Cadherin und p120^{ctn} in MCF-7, PA-TU 8902, MDA-MB-468 und BxPc3 Zellen. Nachweis der Proteine in 25 µg NOP-Proteinlysat durch Western Blots. Der Nachweis von β-Aktin diente der Beladungskontrolle. Abgebildet sind repräsentative Western Blots.

3.1.1 Auswirkungen der Zelldichte auf den Gehalt von E-Cadherin, β-Catenin und p120^{ctn}

Zunächst wurden die Auswirkungen einer unterschiedlichen Wachstumsdichte auf den Gehalt von Bestandteilen des Cadherin-Catenin-Komplexes in verschiedenen humanen Karzinom-Zelllinien untersucht.

In einem ersten Ansatz wurde die Konzentration dieser Proteine in Gesamtproteinlysaten aus Zellen mit unterschiedlicher Wachstumsdichte (subkonfluent, konfluent und superkonfluent) untersucht. Unterschiedliche Wachstumsdichten wurden erreicht, indem die verschiedenen Zellen zunächst mit einer Konfluenz von 60% ausgesät (2 x 10^5 Zellen in 60 mm^2) wurden. Am nächsten Tag wurden die ersten Zellkulturschalen aufgearbeitet. Sie hatten zu diesem Zeitpunkt eine Konfluenz von circa 70% erreicht (subkonfluent). Das bedeutet, dass sie nur wenige Zell-Zell-Kontakte auswiesen und eher vereinzelt

wuchsen. Am darauf folgenden Tag wurden die nächsten Schalen mit einer Konfluenz von circa 95% aufgearbeitet (konfluente Lysate). Hier zeigten die Zellen deutlich mehr interzelluläre Kontakte und wuchsen dichter. Die Zellen, die am dritten Tag aufgearbeitet wurden, hatten eine Konfluenz von 100% erreicht (superkonfluente Lysate) und wuchsen als dichter Zellrasen mit vielen Zell-Zell-Kontakten.

In den Zelllinien PA-TU 8902, MCF-7 und MDA-MB-468 war E-Cadherin als deutliche Bande im Western Blot sichtbar (Abbildung 8). In den MCF-7 Zellen gab es innerhalb der unterschiedlichen Wachstumsdichten keine Unterschiede in der Signalstärke. In den PA-TU 8902 Zellen war dahingegen eine moderate Zunahme und in den MDA-MB-468 Zellen eine leichte Zunahme des E-Cadherin-Signals zwischen den subkonfluent gewachsenen und den dichter gewachsenen Zellen zu sehen. Das insgesamt stärkste Signal für E-Cadherin wiesen die MCF-7 Zellen auf, das schwächste die MDA-MB-468 Zellen.

Der Nachweis von $p120^{ctn}$ ergab ebenfalls eine starke Bande in den drei Zelllinien. Darüber hinaus konnte in allen drei Zelllinien eine Zunahme der Bandenintensität festgestellt werden, wenn die Wachstumsdichte zunahm. Das $p120^{ctn}$-Signal für die subkonfluent gewachsenen Zellen war schwächer, als für die konfluent und superkonfluent gewachsenen. Das intensivste Signal für $p120^{ctn}$ konnte in den MCF-7 Zellen erzielt werden, gefolgt von den PA-TU 8902 Zellen. Die schwächste Bande wiesen die MDA-MB-468 Zellen auf.

Auch β-Catenin war in allen drei Zelllinien nachweisbar. Das Signal nahm bei den MCF-7 nicht zu, wenn die Zellen eine höhere Konfluenz aufwiesen. Bei den PA-TU 8902 Zellen konnte dahingegen eine leichte Zunahme der Signalintensität beobachtet werden. Die MDA-MB-468 Zellen wiesen ebenfalls eine stärkere Bande bei den dichter gewachsenen Zellen auf. Diese Zunahmen waren jedoch sehr viel weniger deutlich, als bei dem vorangegangen Nachweis von $p120^{ctn}$. Die stärkste Bande für β-Catenin war bei MCF-7 Zellen zu beobachten, während die bei PA-TU 8902 und MDA-MB-468 von nahezu gleicher Intensität waren.

Auch die Belichtungsdauer der Filme wurde möglichst gleich gewählt, um eine Verfälschung der Werte durch unterschiedlich lange Expositionszeiten zu verhindern.

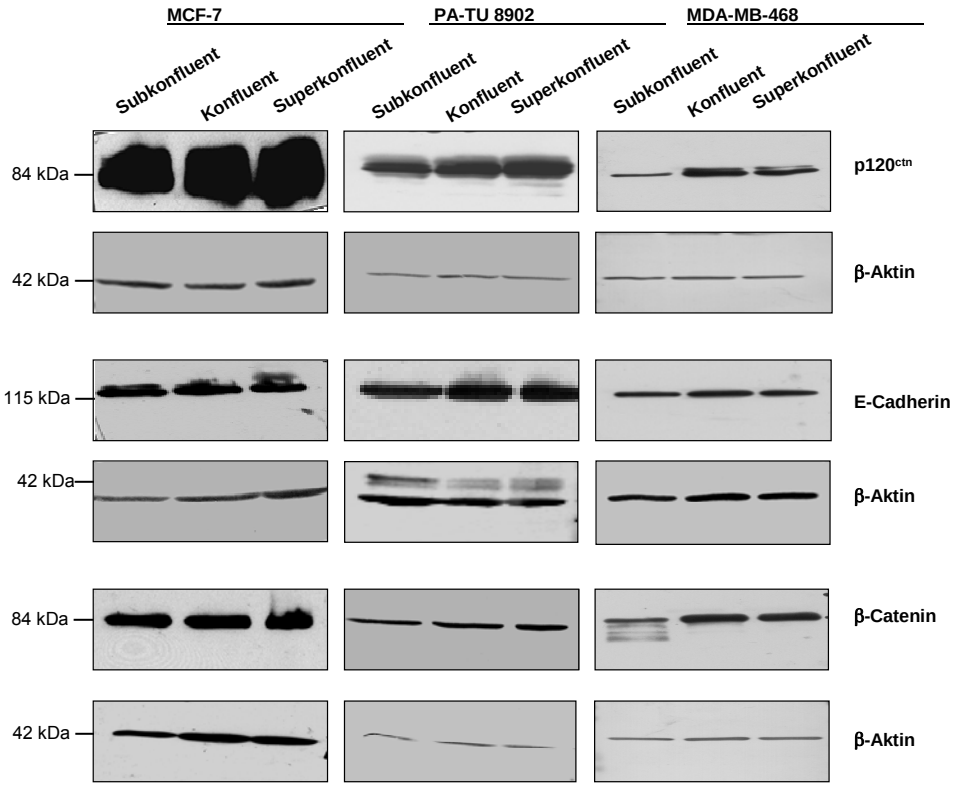


Abbildung 8: Gehalt von E-Cadherin, β-Catenin und p120^{ctn} in Abhängigkeit von einer unterschiedlicher Zelldichte (Konfluenz) in MCF-7, PA-TU 8902 und MDA-MB-468. Nachweis der Proteine in 25 µg NOP-Proteinlysat durch Western Blots. Der Nachweis von β-Aktin diente der Beladungskontrolle. Abgebildet sind repräsentative Western Blots (PA-TU 8902 n=4, MCF-7 n=3, MDA-MB-468 n=2).

Bei der Pankreaskarzinom-Zelllinie BxPc3 war das Western Blot Signal für E-Cadherin und β-Catenin stärker, als jenes für p120^{ctn} (Abbildung Nr.9). Das p120^{ctn}-Signal war bei den subkonfluent gewachsenen Zellen etwas weniger intensiv, als jenes bei den konfluent und superkonfluent gewachsenen Zellen. Auch bei E-Cadherin konnte eine leichte Zunahme in der Signalstärke beobachtet werden, wenn die Wachstumsdichte zunahm. Die Zunahme in der Bandenintensität von E-Cadherin und p120^{ctn} bei Zunahme der Zelldichte war jedoch nicht so stark ausgeprägt, wie bei den MCF-7, PA-TU 8902 und MDA-MB-468 Zellen.

Für β-Catenin konnten keine Unterschiede in der Signalstärke beobachtet werden, wenn der Konfluenzgrad der BxPc3 Zellen zunahm. Alle 3 analysierten Wachstumsdichten weisen in etwa die gleiche Signalstärke für das Protein auf.

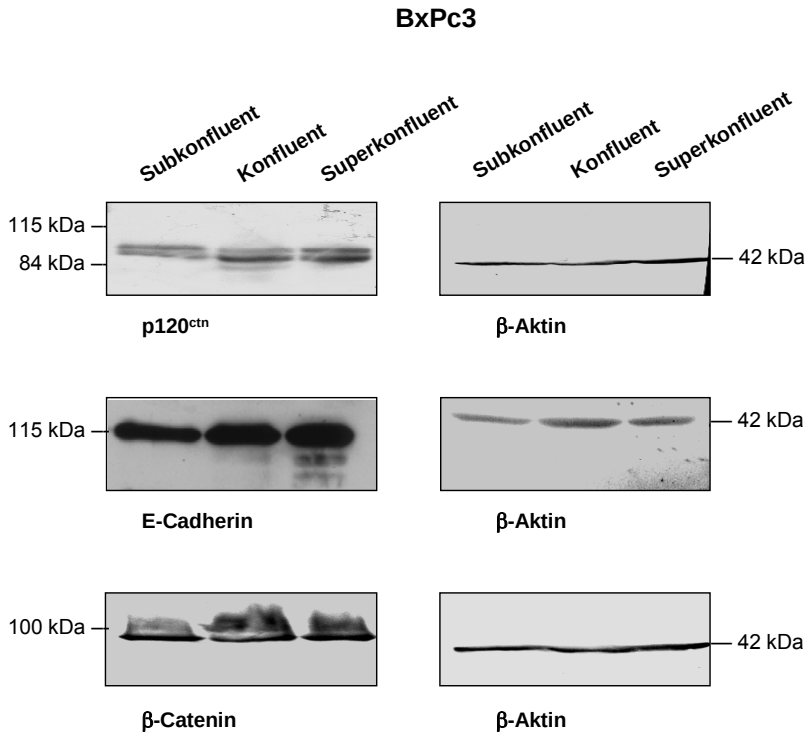


Abbildung 9: Gehalt von E-Cadherin, β-Catenin und p120^{ctn} in Abhängigkeit von einer unterschiedlicher Zelldichte (Konfluenz) in BxPc3 Zelllysaten. Nachweis der Proteine in 25 µg NOP-Proteinlysat durch Western Blots. Der Nachweis von β-Aktin diente der Beladungskontrolle. Abgebildet sind repräsentative Western Blots (n=3).

Zusammenfassend konnten in den Pankreaskarzinom-Zelllinien BxPC3 und PA-TU 8902, sowie in den Brustkrebs-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 Bestandteile des Cadherin-Catenin-Komplexes nachgewiesen werden. Bei den Zelllinien PA-TU 8902, MDA-MB-468 und MCF-7 korrelierte die Zunahme der p120^{ctn}-Konzentration im Gesamtproteinlysat mit einer Zunahme der Zelldichte. Am deutlichsten war dies bei PA-TU 8902 und MCF-7 Zellen der Fall, wohingegen bei BxPc3 nur eine geringe Zunahme der p120^{ctn}-Konzentration zu verzeichnen war.

3.2 Einflüsse der Konfluenz auf die Assoziation von p120^{ctn}, β-Catenin und α-Catenin mit E-Cadherin

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen im Gesamtproteinlysat eine höhere Konzentration des Proteins p120^{ctn} in dichter gewachsenen MCF-7, PA-TU 8902 und MDA-MB-468 Zellen im Vergleich zu weniger dicht gewachsenen Zellen gezeigt werden konnte, sollte nun mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation analysiert werden, welchen Einfluss eine unterschiedliche Zelldichte auf die Zusammensetzung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes hat. Durch die Präzipitation mit einem anti-E-Cadherin-Antikörper wurde der Komplex angereichert und gereinigt. Anschließend wurde mit Western Blots die Menge an co-immunpräzipitiertem p120^{ctn}, β-Catenin und α-Catenin bestimmt. Die Analyse des Komplexes zeigte, dass in den Zelllinien MCF-7 und PA-TU 8902 die Proteine p120^{ctn}, β-Catenin und α-Catenin an E-Cadherin gebunden waren. In den MCF-7 Zellen wies die Bande für co-präzipitiertes α-Catenin die größte Intensität auf, gefolgt von der Bande für β-Catenin, während das Signal für p120^{ctn} etwas weniger stark war. Bei den PA-TU 8902 Zellen war das p120^{ctn}-Signal das stärkste, gefolgt von den Banden für α-Catenin und β-Catenin.

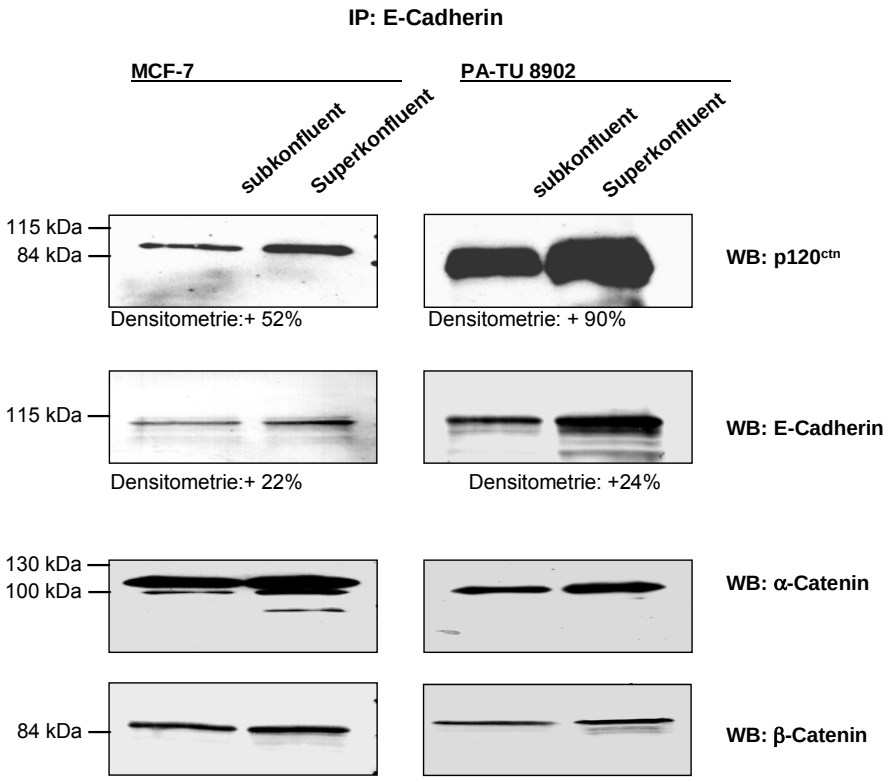


Abbildung 10: Analyse des Cadherin-Catenin-Komplexes in Zellen unterschiedlicher Konfluenz mit Hilfe einer Co-Immunpräzipitation in Lysaten der Zellen MCF-7 und PA-TU 8902. Mit einem anti-E-Cadherin-Antikörper wurde aus 400 µg NOP-Proteinlysat E-Cadherin präzipitiert und assoziiertes α–Catenin, β-Catenin und p120^{ctn} durch Western Blots nachgewiesen. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Präzipitation wurde E-Cadherin nachgefärbt. Abgebildet sind repräsentative Western Blots (n= 3).

Es co-präzipitierte umso mehr p120^{ctn} mit E-Cadherin, je größer die Zelldichte war (Abbildung 10). Es wurden die Zelldichten subkonfluent und superkonfluent gewählt, da hier die Unterschiede in der nachgewiesenen Gesamt-p120^{ctn}-Proteinmenge am Größten waren. Sowohl in der Brustkarzinom-Zelllinie MCF-7 als auch in der Pankreaskarzinom-Zelllinie PA-TU 8902 konnte eine Zunahme des präzipitierten p120^{ctn} in den superkonfluent gewachsenen Zellen beobachtet werden. Der Nachweis von E-Cadherin diente der Kontrolle für eine erfolgreiche Präzipitation. Die Intensität der Proteinbanden für E-Cadherin und p120^{ctn} wurden anschließend densitometrisch ausgewertet. Dies ergab eine Zunahme der Signalstärke für das in der alkalischen Phosphatase Reaktion gefärbte E-Cadherin in den Zellen mit superkonfluenter Zelldichte um 22% in den MCF-7 Zellen, sowie

um 24% in den PA-TU 8902 Zellen. Die Zunahme $p120^{ctn}$-Signalstärke in den Zellen mit superkonfluenter Zelldichte war deutlich größer und betrug 52% in den MCF-7 Zellen und 90% in den PA-TU 8902 Zellen. Normalisiert auf E-Cadherin betrug die Zunahme bei den MCF-7 Zellen 30% und bei den PA-TU 8902 66%.

Die Analyse der Menge des ebenfalls co-präzipitierten α–Catenin und β-Catenin konnte in den MCF-7 Zellen keine Zunahme in Abhängigkeit einer unterschiedlichen Wachstumsdichte beobachtet werden. Hier waren die Zunahme der Bandenintensität für die präzipitierten Proteine α- und β-Catenin in beiden getestete Zelldichten in der Größenordnung der Zunahme der E-Cadherinmenge. Bei PA-TU 8902 konnte bei den Zellen mit superkonfluenter Dichte eine Zunahme des co-präzipitierten α–Catenins verzeichnet werden. Diese Zunahme war jedoch deutlich geringer, als jene des co-präzipitierten $p120^{ctn}$ (Abbildung 10).

Bei den BxPc3 Zellen waren nach Präzipitation von E-Cadherin alle Bestandteile des E-Cadherin-Catenin-Komplexes einschließlich α-Catenin nachzuweisen (Abbildung 11). Die Menge an co-präzipitiertem $p120^{ctn}$ war jedoch in den Zellen unabhängig von der Zelldichte gleich. Es präzipitierte nicht mehr $p120^{ctn}$ gemeinsam mit E-Cadherin in den Zellen, die eine größere Zelldichte aufwiesen. Die beiden anderen co-präzipitierten Proteine, α-Catenin und β-Catenin, zeigten ebenfalls keine Zunahme bei den Zellen mit größerer Zelldichte.

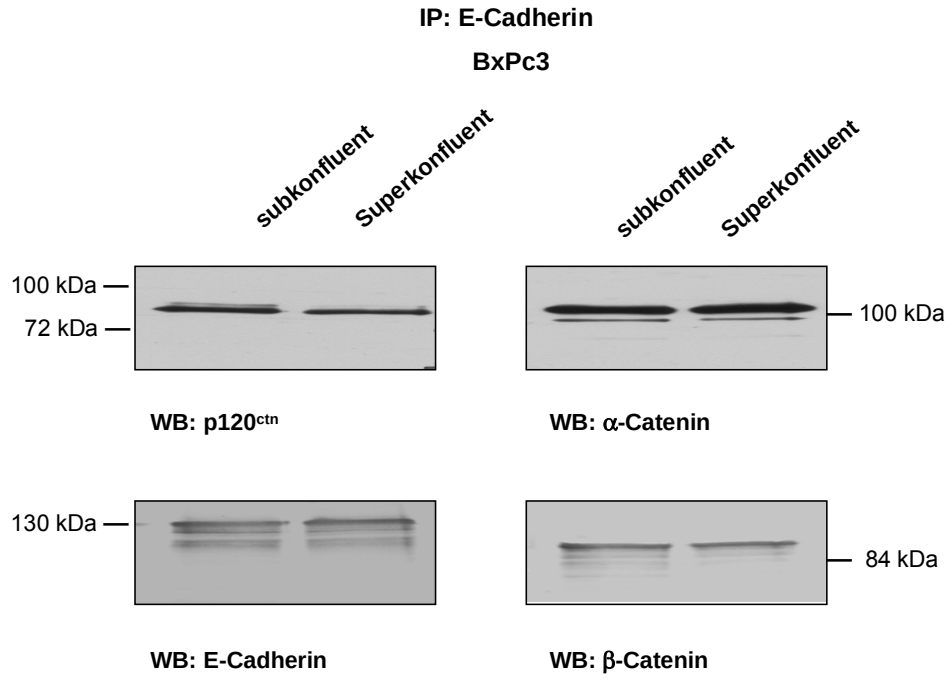


Abbildung 11: Analyse des Cadherin-Catenin-Komplexes in Zellen unterschiedlicher Konfluenz mit Hilfe einer Co-Immunpräzipitation mit BxPc3 Zelllysaten. Mit einem anti-E-Cadherin-Antikörper wurde aus 400 µg NOP-Proteinlysat E-Cadherin präzipitiert und assoziiertes α-Catenin, β-Catenin und $p120^{ctn}$ durch Western Blots nachgewiesen. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Präzipitation wurde ein Blot mit einem anti-E-Cadherin-Antikörper nachgefärbt. Abgebildet sind repräsentative Western Blots (n=3).

3.3 Beeinflussung von E-Cadherin-assoziierten $p120^{ctn}$ durch Veränderungen der extrazellulären Calciumkonzentration

In epithelialem Gewebe stellt E-Cadherin die Grundlage der Zell-Zell-Adhäsion dar. Damit sie stabile Kontakte mit E-Cadherinen der Nachbarzellen ausbilden können, ist die Gegenwart von Calcium absolut notwendig. In dem folgenden Versuch sollte der Einfluss eines Calcium-Entzuges auf die Assoziation von E-Cadherin mit intrazellulärem $p120^{ctn}$ untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden PA-TU 8902 Zellen über Nacht in einem calciumfreien Medium kultiviert. Bei einem Ansatz wurde nach 12 Stunden das Calcium-freie Medium durch calciumhaltiges DMEM (1,8 mM) ersetzt. Der andere Ansatz wurde

nach 12 Stunden mit Wachstumsmedium inkubiert. Ein dritter Ansatz diente als Kontrolle und wurde in Calcium-freiem Medium belassen.

Zunächst wurde im Gesamtlysat untersucht, ob sich die Konzentration von E-Cadherin und p120^{ctn} verändert, wenn den Zellen Calcium entzogen wird (Abbildung 12). Während E-Cadherin in Lysaten von Zellen, die unter diesen Bedingungen kultiviert worden waren, in gleicher Konzentration vorlag, ergaben sich bei p120^{ctn} Unterschiede: die Konzentration von p120^{ctn} war in den Zellen, die lediglich in calciumfreiem Medium kultiviert worden waren, verringert. β-Aktin wurde zum Nachweis eines gleichmäßigen Lysateinsatzes nachgefärbt.

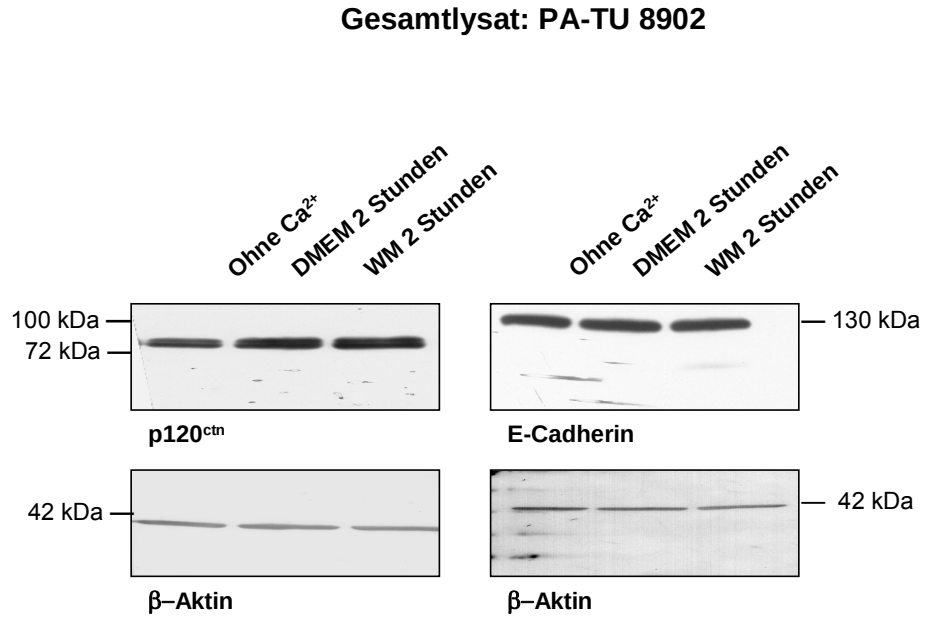


Abbildung 12: Beeinflussung von p120^{ctn} durch Calcium. Nach Entzug von Calcium (Ca^{2+}) für 12 Stunden und anschließender Stimulation der Zellen mit DMEM oder Wachstumsmedium für 2 Stunden, wurden PA-TU 8902 Zellen mit NOP-Lysispuffer aufgearbeitet Anschließend erfolgte der Nachweis der Proteine in 15 µg Proteinlysat durch Western Blots. Zur Beladungskontrolle wurde β-Aktin nachgewiesen. Abgebildet sind repräsentative Western Blots (n=2). (DMEM=Dulbecco's Modified Eagle Medium, WM=Wachstumsmedium)

Nach der Analyse des Gesamtproteinlysats wurde eine Immunpräzipitation mit einem E-Cadherin-spezifischen Antikörper durchgeführt und assoziiertes p120^{ctn} im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 13). Auffällig war, dass in den Zellen, die nach dem Calcium-Entzug für 2 Stunden in Wachstumsmedium kultiviert

worden waren, am wenigsten p120^{ctn} gemeinsam mit E-Cadherin zu präzipitieren war. Die größte Menge an co-präzipitiertem p120^{ctn} konnte in den Zellen beobachtet werden, die in calciumfreiem Zellkulturmedium gewachsen waren. Eine etwas geringere Menge an p120^{ctn} war in den Zellen detektierbar, die in DMEM kultiviert worden waren, nachdem ihnen über Nacht Calcium entzogen worden war. Zur Kontrolle der gleichmäßigen E-Cadherin-Präzipitation wurde E-Cadherin mit einem anti-E-Cadherin Antikörper detektiert.

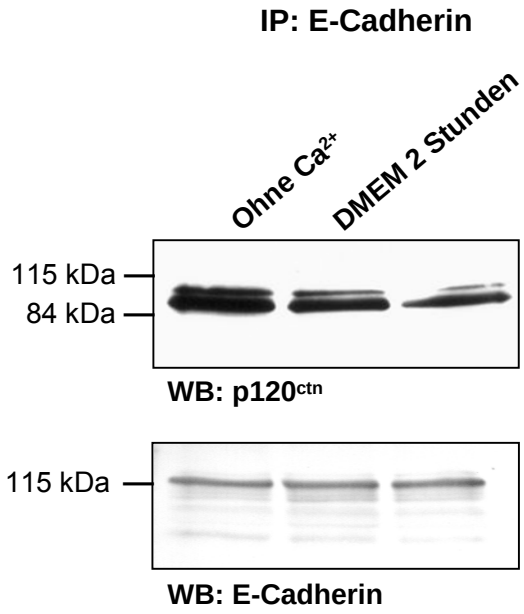


Abbildung 13: Beeinflussung der an E-Cadherin gebundenem p120^{ctn}–Konzentration durch Calcium. Nach Entzug von Calcium (Ca^{2+}) für 12 Stunden und Stimulation mit DMEM oder Wachstumsmedium für 2 Stunden, wurden PA-TU 8902 Zellen mit NOP-Lysispuffer aufgearbeitet. Anschließend wurden aus 400 µg Proteinlysat mit einem anti-E-Cadherin-Antikörper E-Cadherin präzipitiert und assoziiertes p120^{ctn} durch Western Blots nachgewiesen. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Präzipitation wurde E-Cadherin nachgefärbt. Abgebildet sind repräsentative Western Blots (n=3). (DMEM=Dulbecco's Modified Eagle Medium, WM=Wachstumsmedium)

Anschließend wurden die erzielt Bandenintensität densitometrisch ausgewertet. Nachfolgend sind die densitometrischen Messwerte in Abbildung 14 grafisch dargestellt.

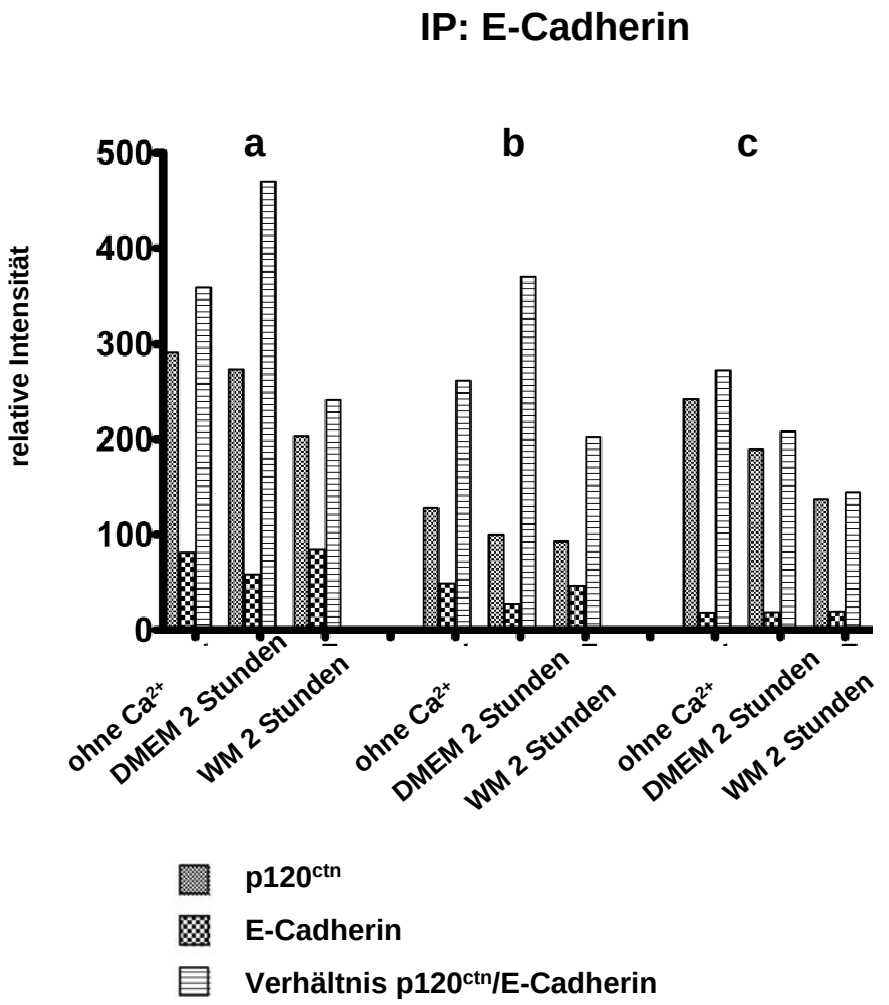


Abbildung 14: Densitometrische Auswertung der in Abbildung 11 beschriebenen Blots. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms IMAGE QUANT. Die Säulenreihen a, b und c entsprechen je einem unabhängigen Versuchsansatz (ohne Calcium, DMEM für 2 Stunden und Wachstumsmedium für 2 Stunden). Ausgewertet wurden 3 Versuche.

Wie aus der Abbildung 14 ersichtlich, präzipitierte am meisten $p120^{ctn}$ gemeinsam mit E-Cadherin in den Zellen, die in einem calciumfreien Medium kultiviert worden waren. In den Zellen, die für 2 Stunden in DMEM kultiviert worden waren, konnte weniger $p120^{ctn}$ präzipitiert werden, als in den Zellen, die die ganze Zeit in calciumfreiem Medium gewachsen waren. Allerdings war hier auch die präzipitierte Menge E-Cadherin geringer, zumindest in den Versuchen a und b. Im dritten Versuch (c) wurde eine gleichmäßige E-Cadherinmenge präzipitiert. Berücksichtigt man die unterschiedlich starke Signale (Abbildung 13) des präzipitierten E-Cadherin und gleicht es rechnerisch aus, so kommt man zu dem Ergebnis, dass in den beiden Säulenreihen a und b die Menge an co-präzipitiertem $p120^{ctn}$ in den mit DMEM behandelten Zellen größer war, als in den

Zellen, die in calciumfreiem Medium oder Wachstumsmedium gewachsen waren. Die geringste Menge an co-präzipitiertem $p120^{ctn}$ ließ sich in den Zellen nachwiesen, die für 2 Stunden in Wachstumsmedium kultiviert worden waren. Obwohl hier die eingesetzte Menge in E-Cadherin höher war, als bei den Zellen, die in DMEM inkubiert worden waren (Säulenreihe a und b).

3.4 Phosphorylierung von $p120^{ctn}$ an verschiedenen Tyrosin-Resten

Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von Proteinen eine wichtige Regulationsmöglichkeit biochemischer Prozesse in Zellen darstellt. Die Phosphorylierung an Tyrosin-Resten wurde in der Vergangenheit mehrfach mit der Regulation der Stabilität Cadherin-Catenin-Komplexes in Verbindung gebracht und in Arbeiten von Reynolds et al. 2004 und Davis et al. 2003 beschrieben. In den folgenden Versuchen sollte der Frage nachgegangen werden, ob die in der Pankreaskarzinom-Zelllinie PA-TU 8902 beobachtete vermehrte Bindung von $p120^{ctn}$ an E-Cadherin in Zellen mit reduziertem Calcium mit einer veränderten Phosphorylierung von $p120^{ctn}$ an bestimmten Tyrosin-Resten einhergeht. Ein besonderes Augenmerk galt hierbei den Tyrosin-Resten Y96, Y228, Y280 und Y91.

Als Ausgangspunkt des Versuches wurden PA-TU 8902 Zellen über Nacht in einem calciumfreien Medium kultiviert. Bei einem Ansatz wurden die Zellen nach 12 Stunden für 30 Minuten mit DMEM inkubiert, während der andere Ansatz für 30 Minuten in Wachstumsmedium kultiviert wurde. Zwei weitere Ansätze wurden in calciumfreiem Medium belassen. Einer davon wurde für 10 Minuten mit dem Wachstumsfaktor EGF stimuliert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der Zellen mit RIPA-Lysispuffer, der mit Phosphatase-Inhibitoren angereichert war.

Es zeigte sich, dass $p120^{ctn}$ tatsächlich an drei der getesteten Tyrosin-Reste phosphoryliert vorliegt: Für die Tyrosin-Reste Y96, Y228 und Y291 konnte generell eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Allerdings nicht unter allen getesteten Bedingungen gleichermaßen; die verschiedenen Tyrosine wiesen deutliche Unterschiede in ihrem Phosphorylierungsmuster auf und lagen nicht in allen Versuchsansätzen phosphoryliert vor (Abbildung 15).

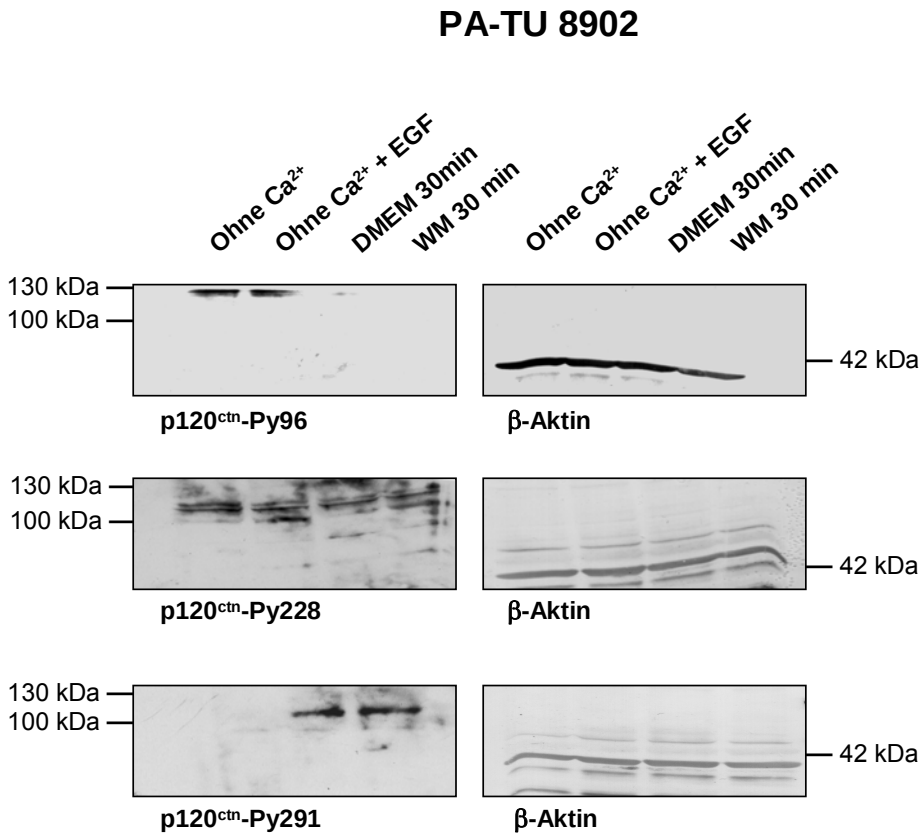


Abbildung 15: Phosphorylierung von p120^{ctn} an verschiedenen Tyrosin-Resten. Nachweis der phosphorylierten Proteine in 25 µg RIPA-Lysat mit Phosphatase-Inhibition. Es wurden Lysate aus verschieden behandelten Zellen hergestellt: DMEM ohne Ca^{2+} (Ohne Ca^{2+}), DMEM ohne Ca^{2+} und Stimulation mit EGF für 10 Minuten (Ohne Ca^{2+} + EGF), DMEM für 30 Minuten (DMEM 30 min) und Wachstumsmedium für 30 Minuten (WM 30 min). Die phosphorylierten Proteine wurden mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die Färbung von β-Aktin dient der Beladungskontrolle. Abgebildet sind repräsentative Western Blots (p120^{ctn}-Py96 und p120^{ctn}-Py291 n=3, p120^{ctn}-Py228 n=2). (EGF=*endothelium growth factor*, DMEM=Dulbecco's Modified Eagle Medium, WM=Wachstumsmedium)

Der Tyrosin-Rest Y96 war nur in den Lysaten von Zellen, die ohne Calcium inkubiert wurden, sowie nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF phosphoryliert. Der Tyrosin-Rest Y228 war hingegen während aller getesteten Versuchsanordnungen gleichermaßen phosphoryliert. Es ist hier auch die für p120^{ctn} so charakteristische Doppelbande nachweisbar, die bei den ebenfalls phosphorylierten Tyrosinen Y96 und Y291 nicht zu beobachten war.

Die Phosphorylierungsstelle Y291 wies dahingegen lediglich eine Phosphorylierung in den Zellen auf, die mit DMEM oder Wachstumsmedium stimuliert worden waren. Die letzte getestete potentielle Phosphorylierungsstelle betraf den Tyrosin-Rest Y280, wobei sich dort in keinem der verschiedenen Versuchsansätze eine Phosphorylierung nachweisen ließ (nicht abgebildet). Als Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung diente jeweils der Nachweis von β–Aktin.

3.4.1 Auswirkungen des Zellwachstums auf die Phosphorylierung von $p120^{ctn}$ an Tyrosin-Rest Y96

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche mit phosphospezifischen Antikörpern sollte nun der Frage nachgegangen werden, welche Auswirkungen eine unterschiedliche Zelldichte auf die Phosphorylierung von $p120^{ctn}$ in Karzinom-Zellen hat. Dieses Mal galt besonderes Interesse dem Phosphorylierungszustand des Tyrosin-Rests Y96, da nur dieser auch in Zellen, die in calciumfreiem Medium inkubiert worden waren, phosphoryliert war. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung an Tyrosin Y96 und der Auflösung und Neubildung des E-Cadherin-Catenin-Komplexes sprechen.

Hierfür wurden PA-TU 8902 Zellen unterschiedlich dicht ausgesät und für 12 Stunden durch eine Kultivierung in DMEM-Zellkulturmedium synchronisiert. Anschließend wurde eine Zellkulturschale mit Orthovanadat inkubiert, während die andere unverändert in DMEM kultiviert wurde. Orthovanadat verlangsamt die Abnahme der Tyrosin-Phosphorylierung durch Inhibierung verschiedener Tyrosinphosphatasen. Nach einer Stunde wurden Zelllysate mit RIPA-Lysispuffer inklusive mehrerer Phosphatase-Inhibitoren hergestellt.

Hier konnte in den Gesamtproteinlysaten, die nach Inkubation mit Orthovanadat hergestellt worden waren, eine deutlich stärkere Bande für $p120^{ctn}$–Py96 (phosphorylierter $p120^{ctn}$-Tyrosin-Rest Y96) beobachtet werden, als in den Lysaten nicht-behandelter Zellen. Am auffälligsten war dieser Unterschied in der Signalstärke nach Inkubation der Zellen mit Orthovanadat, die subkonfluent und konfluent gewachsen waren. Das Western Blot Signal für den phosphorylierten Tyrosin-Rest Y96 in den Zellen mit superkonfluentem Wachstum war bei den

Lysaten aus nicht-behandelten Zellen von höherer Intensität, als jenes bei den mit Orthovanadat behandelten Zellen, allerdings könnte es sich hierbei um ein Artefakt im Sinne eines unregelmäßig verteilten Färbereagenzes handeln.

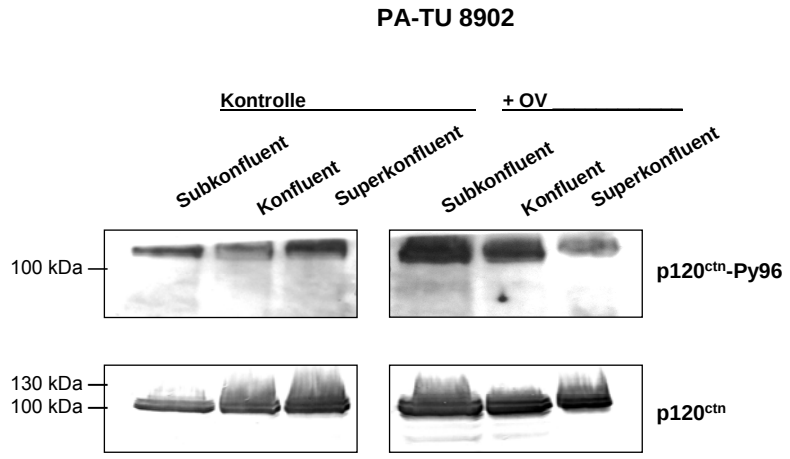


Abbildung 16: Phosphorylierung von p120^{ctn} an Tyrosin-Rest Y96. Nachweis des phosphorylierten p120^{ctn}-Tyrosin-Rests Y96 in 30 µg RIPA-Lysat mit Phosphatase-Inhibition. Hierfür wurden PA-TU 8902 Zellen unterschiedlich dicht ausgesät und für 12 Stunden in DMEM synchronisiert. Anschließend wurde eine Hälfte der Zellkulturschalen für eine Stunde mit Orthovanadat (OV) behandelt, während die andere Hälfte unverändert in DMEM (DMEM=Dulbecco's Modified Eagle Medium) kultiviert wurde. Zum Nachweis der p120^{ctn}-Gesamtmenge wurden die Blots mit einem p120^{ctn}-spezifischen Antikörper und alkalischen Phosphatase (AP) Reaktion nachgefärbt. Abgebildet sind repräsentative Westernblots (n=3).

Im Gesamtproteinlysaten der Kontroll-Zellen nahm das Western Blot Signal für p120^{ctn}–Py96 zu, je größer die Zelldichte war. Die subkonfluenten und die konfluenten Zellen zeigten eine schwächere Bande, als die superkonfluenten Zellen. Diese Zunahme ist in moderaterer Art und Weise auch in der alkalischen Phosphatase Nachfärbung der Blots mit einem anti-p120^{ctn}-Antikörper (Abbildung 16) zu sehen. Hier ist die Bande für die subkonfluent gewachsenen Zellen unwesentlich schwächer, als die der Zellen mit größerer Dichte. Dieses Ergebnis kann als erneuter Hinweis darauf gewertet werden, dass die Konzentration von p120^{ctn} in superkonfluent gewachsenen Zellen höher ist, als in weniger dicht gewachsenen Zellen. Dies ist als Übereinstimmung mit den in den Vorversuchen erzielten Ergebnissen zu werten (Abbildung 7). Da die Intensitätszunahme des p120^{ctn}-Signals schwächer ist, als die Zunahme des Signals für den phosphospezifischen Antikörper p120^{ctn}-Py96, kann des Weiteren davon

ausgegangen werden, dass in Zellen mit größerer Wachstumsdichte nicht nur mehr $p120^{ctn}$ vorhanden, sondern auch ein höherer Phosphorylierungsgrad, zumindest für den Tyrosin-Rest Y96, vorliegt.

Etwas anders verhält es sich in den Zellen, die für eine Stunde mit Orthovanadat inkubiert worden waren. Hier zeigte sich eine stärkere Bande bei den subkonfluenten Zellen, als bei den Zellen mit größerer Zelldichte. Bei der alkalischen Phosphatase Nachfärbung der mit Orthovanadat behandelten Zellen mit $p120^{ctn}$–spezifischem Antikörper zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede in der Signalintensität zwischen den unterschiedlich dicht gewachsenen Zellen.

3.5 Einfluss der kleinen GTPasen Rho und Rac1 auf den E-Cadherin-Adhäsionskomplex

3.5.1 Inhibierung der Rho- und Rac-GTPasen

In den nachfolgenden Versuchen sollten durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren der Rho-Kinase (ROCK-Inhibitor) und der Rac1-GTPase die Auswirkungen der Inhibiton der Rho-Kinase und von Rac1 auf die Verteilung von $p120^{ctn}$ und E-Cadherin in Pankreas- und Brustkrebszellen näher charakterisiert werden. Der ROCK-Inhibitor hemmt die Rho-Kinase und sorgt so für eine Unterbrechung des Rho-Signaltransduktionsweges. Die Einflüsse von Rho auf das Aktin-Cytoskelett können so erfolgreich inhibiert werden.

Hierfür wurden PA-TU 8902 und MCF-7 Zellen zu 60% konfluent ausgesät, bevor am nächsten Tag ein Medienwechsel vorgenommen wurde. Eine Stunde später wurden die ROCK- und Rac1-Inhibitoren hinzugegeben. Die Aufarbeitung mit NOP-Lysispuffer erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Es wurden Zeiträume von 6 und 12 Stunden nach Zugabe der Inhibitoren untersucht.

Bei der Pankreaskarzinom-Zelllinie PA-TU 8902 waren die Banden für $p120^{ctn}$ und E-Cadherin im Gesamtlysat nahezu gleich, egal ob die Zellen für 6 oder für 12 Stunden mit dem ROCK-Inhibitor inkubiert worden waren. Genauso verhielt es sich bei den mit dem Rac1-Inhibitor behandelten Zellen. Es waren auch keine Unterschiede zwischen den Lysaten unbehandelter Kontroll-Zellen und den Lysaten der mit ROCK- und Rac1-Inhibitor versetzten Zellen detektierbar.

Etwas anders verhielt es sich bei der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7. Hier zeigte sich, dass die $p120^{ctn}$–Konzentration nach einer ROCK-Inhibierung, verglichen mit unbehandelten bzw. mit Rac1-Inhibitor-behandelten Zellen, abnham (Abbildung 17). Hierbei war es jedoch unerheblich, ob der Inhibitor für 6 oder für 12 Stunden einwirken konnte. Für beide Zeiträume konnte eine vergleichbare Reduktion der Bandenintensität erzielt werden.

Bei der Nachfärbung mit einem E-Cadherin-spezifischen Antikörper und alkalischen Phosphatase Reaktion ließ sich nachweisen, dass die E-Cadherin-Menge nach Inhibition der Rho-Kinase ebenfalls deutlich verringert war. Eine β-Aktin-Färbung zeigte, dass keine Beladungsunterschiede vorlagen.

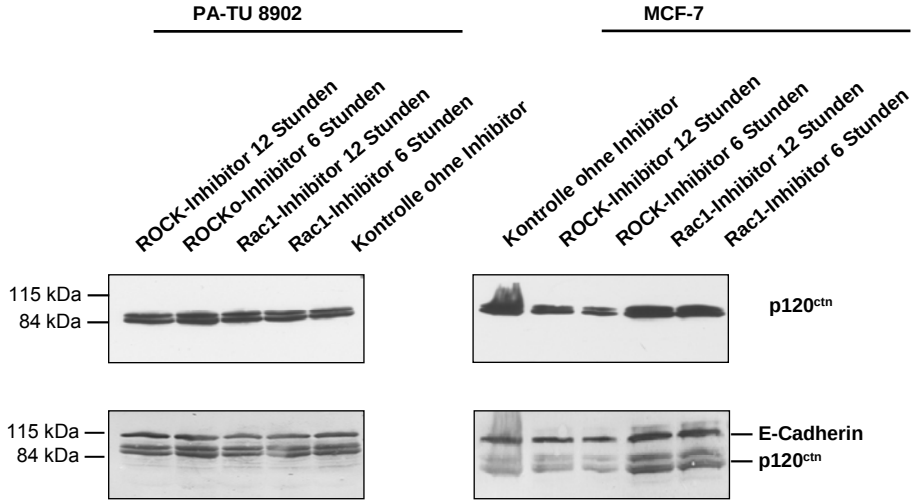


Abbildung 17: Inhibierung der kleinen GTPasen Rho und Rac1. PA-TU 8902 und MCF-7 Zellen wurden 6 bzw. 12 Stunden mit Inhibitoren inkubiert und mit NOP-Lysispuffer lysiert. In 20 µg Proteinlysat wurde $p120^{ctn}$ und E-Cadherin durch Western Blots detektiert. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=2). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

3.5.2 Die Assoziation von $p120^{ctn}$ mit E-Cadherin wird durch Rho- und Rac1-GTPasen beeinflusst

Nachdem die Auswirkungen einer Inhibierung der kleinen GTPasen Rho und Rac1 auf die zelluläre Konzentration von $p120^{ctn}$ im Gesamtproteinlysat getestet worden waren, sollten die Effekte einer solchen Inhibierung auf die Assoziation von $p120^{ctn}$ mit E-Cadherin betrachtet werden. Da in den vorangegangenen Versuchen kein erkennbarer Unterschied zwischen den Inkubationszeiträumen der Zellen mit Inhibitoren bestanden hatte, wurde für die nun folgenden Immunpräzipitationen die 12 stündige Inkubationszeit gewählt. Aus 500 µg NOP-Lysat wurde $p120^{ctn}$ immunpräzipitiert und co-präzipitiertes E-Cadherin mit Hilfe eines Western Blots detektiert. Ein unspezifischer Antikörper wurde eingesetzt, um die Spezifität des anti-$p120^{ctn}$ Antikörpers zu kontrollieren (Abbildung 18).

Bei den PA-TU 8902 Zellen konnte nach Rac1-Inhibierung die größte Menge E-Cadherin mit $p120^{ctn}$ co-präzipitiert werden. Das Signal war deutlich stärker, als jenes der unbehandelten Kontroll-Zellen und auch stärker, als das der Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase. Verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Zellen erhöhte auch die Inhibierung der Rho-Kinase die Menge co-präzipitierten E-Cadherins. Dieser Effekt war jedoch geringer ausgeprägt als nach der Inhibierung von Rac1. Somit erhöhte sowohl die Inhibierung der Rho-Kinase, als auch die von Rac1 die Menge des E-Cadherin-Adhäsionskomplexes.

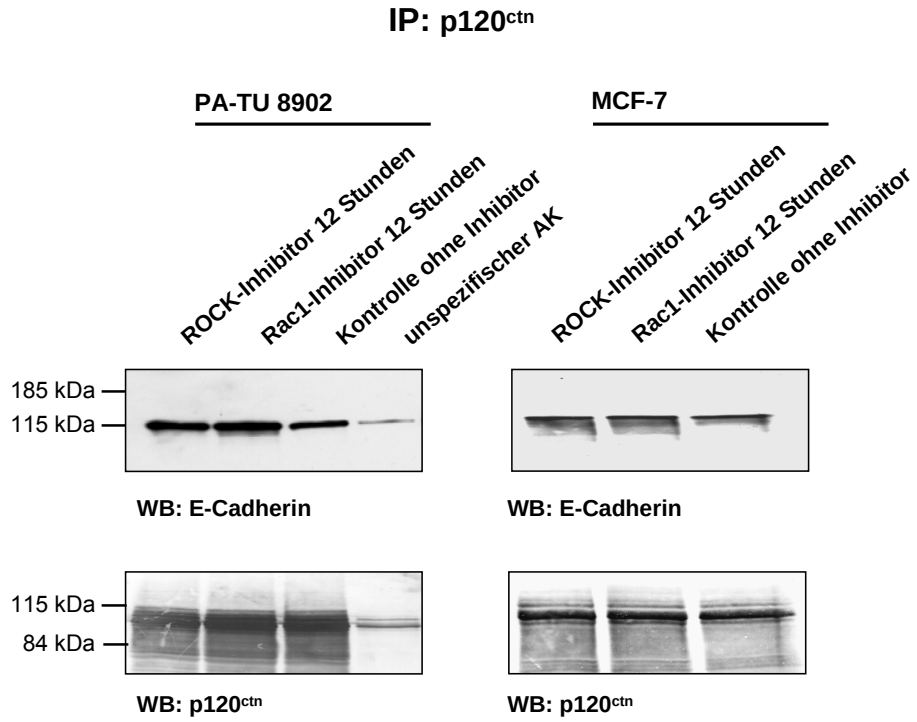


Abbildung 18: Analyse der E-Cadherin-p120^{ctn}–Interaktion in PA-TU 8902 und MCF-7 Zellen nach Inhibierung der kleinen GTPasen Rho und Rac1. Mit einem anti-p120^{ctn}–Antikörper wurde aus 500 µg NOP-Proteinlysat p120^{ctn} präzipitiert und assoziiertes E-Cadherin durch Western Blots nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde p120^{ctn} nachgefärbt. Zum Nachweis der Spezifität des anti-p120^{ctn}–Antikörpers wurde die Immunpräzipitation zusätzlich mit einem unspezifischer Antikörper (AK) durchgeführt. Abgebildet sind repräsentative Blots (PA-TU 8902 n=4, MCF-7 n=3). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

Die Immunpräzipitation mit dem unspezifischen Antikörper ergibt nur ein sehr schwaches Signal für E-Cadherin, das als nicht-spezifischer Hintergrund betrachtet werden muss. Als Kontrolle der erfolgreichen Präzipitation wurde das präzipitierte p120^{ctn} nachgefärbt. Auch hier ergab sich durch die Immunpräzipitation mit dem unspezifischen Antikörper nur eine schwache Bande für p120^{ctn}.

Bei der MCF-7 Zelllinie war das schwächste E-Cadherin-Signal bei den Lysaten unbehandelter Kontroll-Zellen zu finden, verglichen mit Lysaten aus Zellen nach Inhibierung der kleinen GTPasen Rho und Rac1 (Abbildung 18). Zwischen der Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1 zeigte sich dahingegen kein Unterschied in der Signalintensität für E-Cadherin. Die Nachfärbung mit einem

p120^{ctn}–spezifischen Antikörper und alkalischer Phosphatase Reaktion diente dem Nachweis einer erfolgreichen Immunpräzipitation.

3.5.3 Einfluss von Rho und Rac1 auf die Cytoskelett-Assoziation von E-Cadherin

Triton X-100 löst die Zellmembranen auf, wodurch Proteine in verschiedene Fraktionen getrennt werden können. Die Triton X-100-lösliche Fraktion enthält Proteine, die sich frei im Cytosol befinden, sowie Membranproteine, die nicht an das Cytoskelett gebunden sind. Die Triton X-100-unlösliche Fraktion beinhaltet dahingegen Proteine, die mit dem Cytoskelett assoziiert sind, sowie große Protein-Komplexe. Durch die Aufarbeitung der mit Rho- und Rac1-Inhibitor behandelten MCF-7 Zellen mit einem Triton X-100 enthaltenden Lysispuffer konnte eine unterschiedliche zelluläre E-Cadherin-Verteilung in den mit Inhibitoren behandelten Zellen gezeigt werden (Abbildung 19).

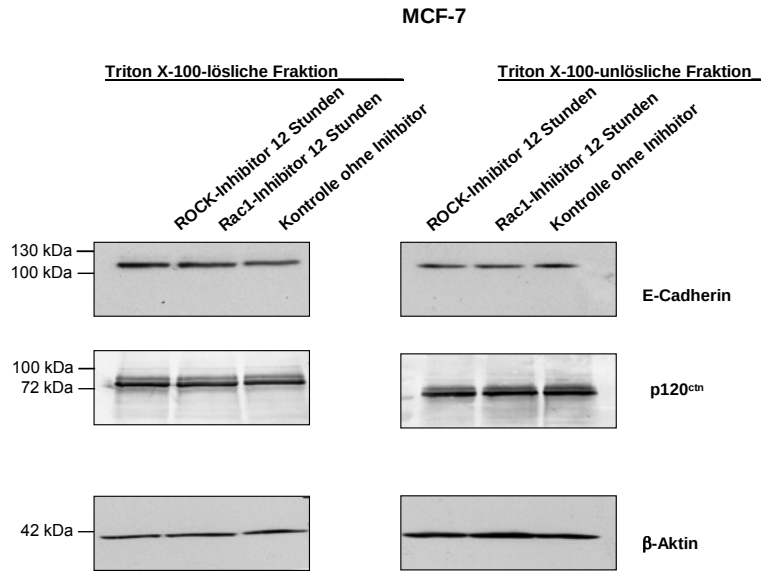


Abbildung 19: E-Cadherin-Verteilung nach Triton X-100-Fraktionierung in MCF-7 Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1. Nach Applikation des Rho-Kinase Inhibitors (ROCK-Inhibitor), sowie des Rac1-Inhibitors (Rac1-Inhibitor) wurden die Zellen mit einem Triton-X-100 enthaltenden Lysispuffer aufgearbeitet. Durch die anschließende Zentrifugation wurden die Lysate in eine Triton X-100-lösliche und eine Triton X-100-unlösliche Fraktion getrennt. Mittels Western Blots wurde E-Cadherin und p120^{ctn} nachgewiesen. Der Nachweis von β-Aktin diente der Beladungskontrolle. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=4). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

Die Zellen wurden für diesen Versuch mit einer Konfluenz von 60% ausgesät und für 24 Stunden belassen. Danach wurden sie für 12 Stunden mit den Inhibitoren inkubiert und lysiert. In der Triton X-100-löslichen Fraktion war die E-Cadherin-Konzentration in den mit Inhibitoren behandelten Zellen höher, als in den unbehandelten Kontroll-Zellen. Hierbei führte die Inhibierung der Rho-Kinase zu einer stärkeren Zunahme der E-Cadherin-Konzentration als die Rac1-Inhibierung.

In der Triton X-100-unlöslichen Fraktion zeigte sich eine inverse E-Cadherinverteilung. Obwohl die erzielten Unterschiede in der Signalstärke nicht sehr ausgeprägt waren und es nur kleine Unterschiede gab, ist doch erkennbar, dass die E-Cadherin-Bande bei den unbehandelten Kontroll-Zellen die stärkste war und das Signal für E-Cadherin in den Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und Rac1 eine etwas geringere Intensität hatte. Somit war die E-Cadherin-Gesamtmenge, trotz einer unterschiedlichen komplementären Verteilung, konstant. Insgesamt wiesen die Signale für E-Cadherin bei gleicher Belichtungszeit der Filme, in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion eine geringere Intensität auf, als jene der Triton X-100-löslichen Fraktion. Diese Verteilung weist darauf hin, dass nach Inhibition der Rho-Kinase oder von Rac1 E-Cadherin vom Cytosklett dissoziiert.

Mit einem $p120^{ctn}$–spezifischen Antikörper wurde nun $p120^{ctn}$ analysiert. Hierbei konnten weder in der Triton X-100-löslichen noch in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion Unterschiede in der Signalintensität zwischen den mit Inhibitoren behandelten Zellen und den unbehandelten Kontroll-Zellen gezeigt werden. Es fiel lediglich auf, dass die Signalintensität für $p120^{ctn}$ bei gleicher Belichtungszeit der Filme in der der Triton X-100-unlösliche Fraktion insgesamt stärker war, als in der Triton X-100-löslichen Fraktion (Abbildung 19).

Der Nachweis einer gleichmäßigen Gelbeladung erfolgte durch die Nachfärbung mit einem β-Aktin-spezifischen Antikörper und alkalischer Phosphatase Reaktion (Abbildung 19). Obwohl keine Unterschiede zwischen den mit Inhibitor behandelten Zellen und den unbehandelten Kontroll-Zellen bestanden, gilt es zu berücksichtigen, dass die kleinen GTPasen Rho und Rac1 auch das Cytoskelett-Protein β-Aktin beeinflussen können.

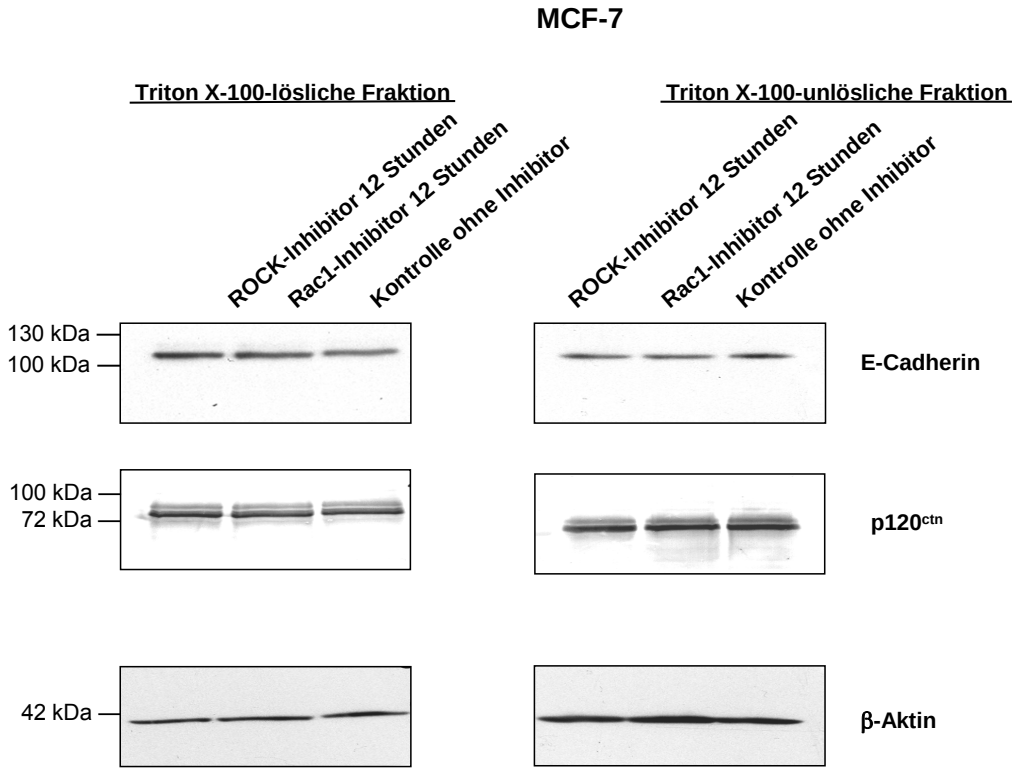


Abbildung 20: E-Cadherin Verteilung nach Triton X-100-Fraktionierung in PA-TU 8902 Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1. Nach Applikation des Rho-Kinase Inhibitors (ROCK-Inhibitor), sowie des Rac1-Inhibitors (Rac1-Inhibitor) wurden die Zellen mit einem Triton X-100 enthaltenden Lysispuffer aufgearbeitet. Mittels Western Blots wurde E-Cadherin und $p120^{ctn}$ nachgewiesen. Der Nachweis β-Aktin diente der Beladungskontrolle. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=4). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

Während bei den MCF-7 Zellen eine Abnahme der E-Cadherin-Konzentration in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion nach Inhibition der Rho-Kinase oder von Rac1 gezeigt werden konnte, waren solche Unterschiede bei den PA-TU 8902 Zellen weder innerhalb der Triton X-100-löslichen noch in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion zu beobachten. Die Signalintensität der Zellen nach Inhibierung von Rho und Rac1 unterschied sich nicht von der, unbehandelter Kontroll-Zellen (Abbildung 20).

3.5.4 E-Cadherin-Verteilung nach einer 48-stündigen Inhibierung der kleinen GTPasen Rho und Rac1

Es stellte sich daraufhin die Frage, ob eine 48-stündige Inkubierung der Zellen mit dem ROCK- und Rac1-Inhibitor deutlichere Unterschiede auf die E-Cadherin-Konzentration oder –Verteilung haben würde. Hierfür wurde die bereits oben beschriebene Versuchsanordnung gewählt, die Zellen aber für jeweils 48 Stunden mit Inhibitoren inkubiert. In regelmäßigen Abständen, sowie vor der Aufarbeitung mit dem Triton X-100-Puffer wurde die Zellmorphologie mikroskopisch kontrolliert, um auszuschließen, dass sich aufgrund toxischer Wirkung der Inhibitoren die Zellen veränderten.

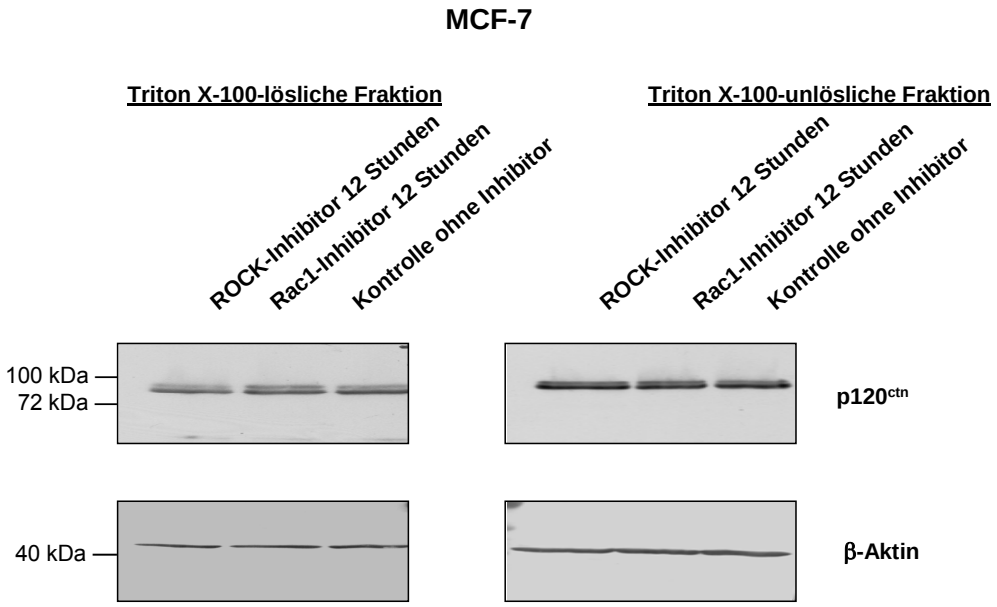


Abbildung 21: E-Cadherin-Verteilung nach Triton X-100-Fraktionierung in MCF-7 Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1. Nach Applikation des Rho-Kinase Inhibitors (ROCK-Inhibitor), sowie des Rac1-Inhibitors (Rac1-Inhibitor) für 48 Stunden wurden die Zellen mit einem Triton X-100 enthaltenden Lysispuffer aufgearbeitet. Mittels Western Blots wurde E-Cadherin und $p120^{ctn}$ nachgewiesen. Der Nachweis von β-Aktin diente der Beladungskontrolle. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=2). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

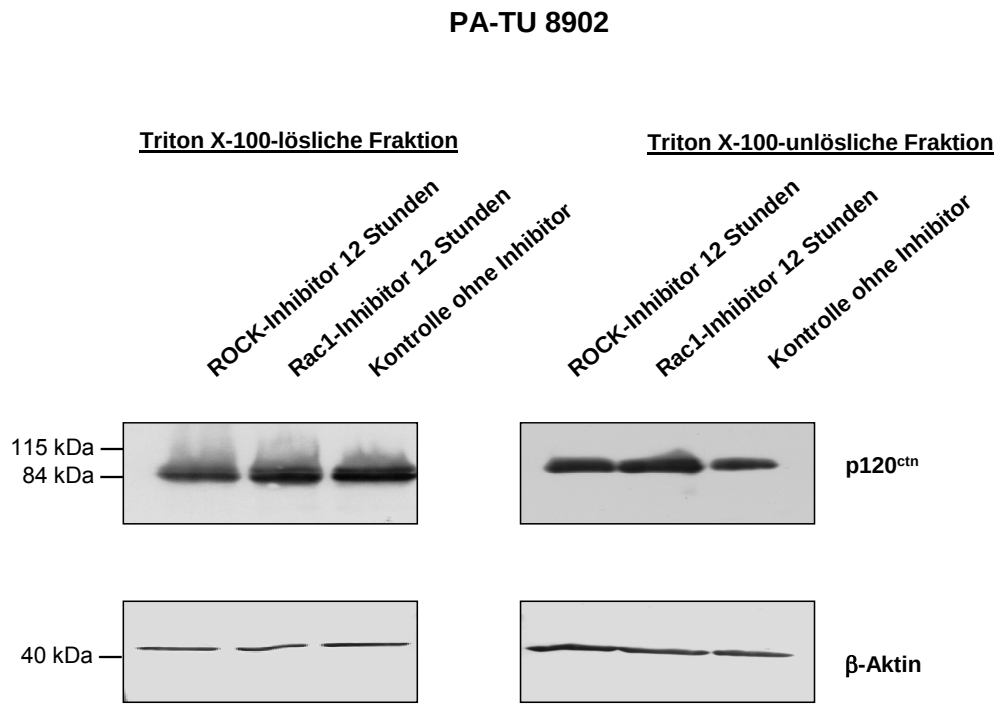


Abbildung 21: E-Cadherin Verteilung nach Triton X-100-Fraktionierung in PA-TU 8902 Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1. Nach Applikation des Rho-Kinase Inhibitors (ROCK-Inhibitor), sowie des Rac1-Inhibitors (Rac1-Inhibitor) für 48 Stunden wurden die Zellen mit einem Triton X-100 enthaltenden Lysispuffer aufgearbeitet. Mittels Western Blots wurde E-Cadherin und $p120^{ctn}$ nachgewiesen. Der Nachweis von und β-Aktin diente der Beladungskontrolle. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=2). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

Auch bei verlängerter Inkubationszeit der Inhibitoren konnten in der Triton X-100-löslichen bzw. in der -unlöslichen Fraktion beider Zelllinien keine Veränderung der E-Cadherin-Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen beobachtet werden. Das Signal für E-Cadherin in den unbehandelten Kontroll-Zellen war bei den MCF-7 Zellen zwar etwas schwächer, als jenes der Zellen nach Inhibitor-Applikation, aber die Nachfärbung von β-Aktin ergab bei den unbehandelten MCF-7 Kontroll-Zellen ebenfalls ein schwächeres Signal, so dass dieser leichte Unterschied in der Signalstärke entweder von einem geringeren Lysateinsatz bei den Kontroll-Zellen herrühren könnte, oder aber ein Hinweis darauf ist, dass eine Inhibierung der kleinen GTPasen auch die Konzentration das Cytoskelett-Proteins β-Aktin beeinflusst (Abbildung 21). Eine Verstärkung der Effekte, die durch die 12-stündige Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1

hervorgerufen worden waren, konnte weder bei den MCF-7, noch bei den PA-TU 8902 Zellen beobachtet werden.

3.5.5 Immunlokalisation von E-Cadherin, p120^{ctn}, β-Catenin und β-Aktin in MCF-7 Zellen nach Inhibierung der kleinen GTPasen Rho und Rac1

Als nächstes sollten nun mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht werden, ob sich die Morphologie der Zellen, oder die Lokalisation der Hauptbestandteile des E-Cadherin-Catenin-Komplexes verändert, wenn die kleinen GTPasen Rho und Rac1 inhibiert werden. Hierzu wurden die Karzinom-Zelllinien MCF-7 und PA-TU 8902 auf Deckgläsern ausgesät. Nach 24 Stunden wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Eine Stunde später erfolgte die Zugabe des ROCK- oder des Rac1-Inhibitors für 12 Stunden.

In den MCF-7 Zellen war zu erkennen (Abbildung 23), dass die Zellen, die mit Inhibitoren behandelt worden waren, im Vergleich mit den unbehandelten Kontroll-Zellen, weniger strukturiert gewachsen waren. Zeigten die Kontroll-Zellen (Abbildung 6) gut polarisierte und differenzierte Zellen mit scharf begrenzten Arealen der Zell-Zell-Adhäsion, war dies bei den Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase oder von Rac1 nicht mehr der Fall. Dies war besonders gut bei der Immunlokalisation von p120^{ctn} nach ROCK-Inhibierung erkennbar. In den unbehandelten Kontroll-Zellen war p120^{ctn} vor allem in der Zellmembran, besonders in Bereichen der Zell-Zell-Kontakte. In den Zellen nach Hinzugabe der Inhibitoren war p120^{ctn} nicht mehr als scharfe Linie im Bereich der Zellmembran sichtbar. Dieses ist unter anderem durch eine erhöhte Menge intrazellulärem p120^{ctn} zu erklären, so dass p120^{ctn} in den mit Inhibitor behandelten Zellen eventuell an intrazelluläre Proteine gebunden vorliegt. Die Zellen wiesen außerdem eine geringere Diffenzierung bzw. Polarität auf, was sich in den unscharf begrenzten Zell-Zell-Kontakten und unregelmäßigeren Zellformen erkennen lässt. Die Rac1-Inhibierung führte zu ähnlichen Effekten, die aber geringer ausgeprägt waren als diese nach Inhibierung der Rho-Kinase (Abbildung 23).

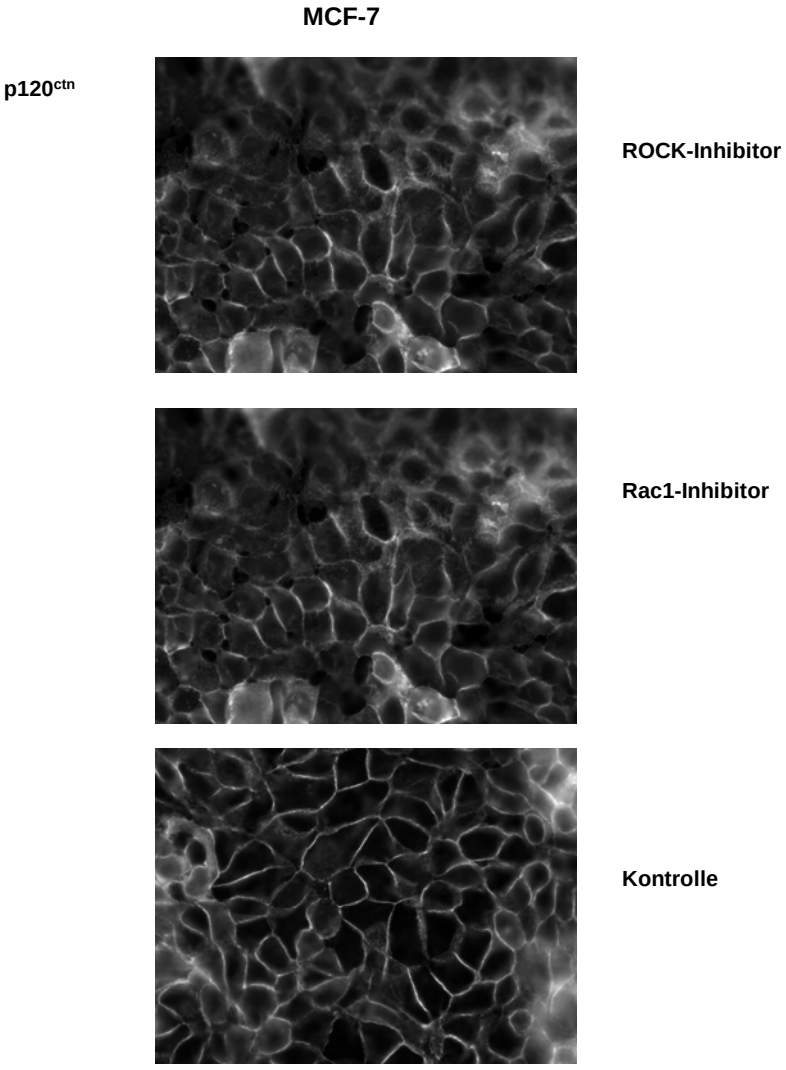
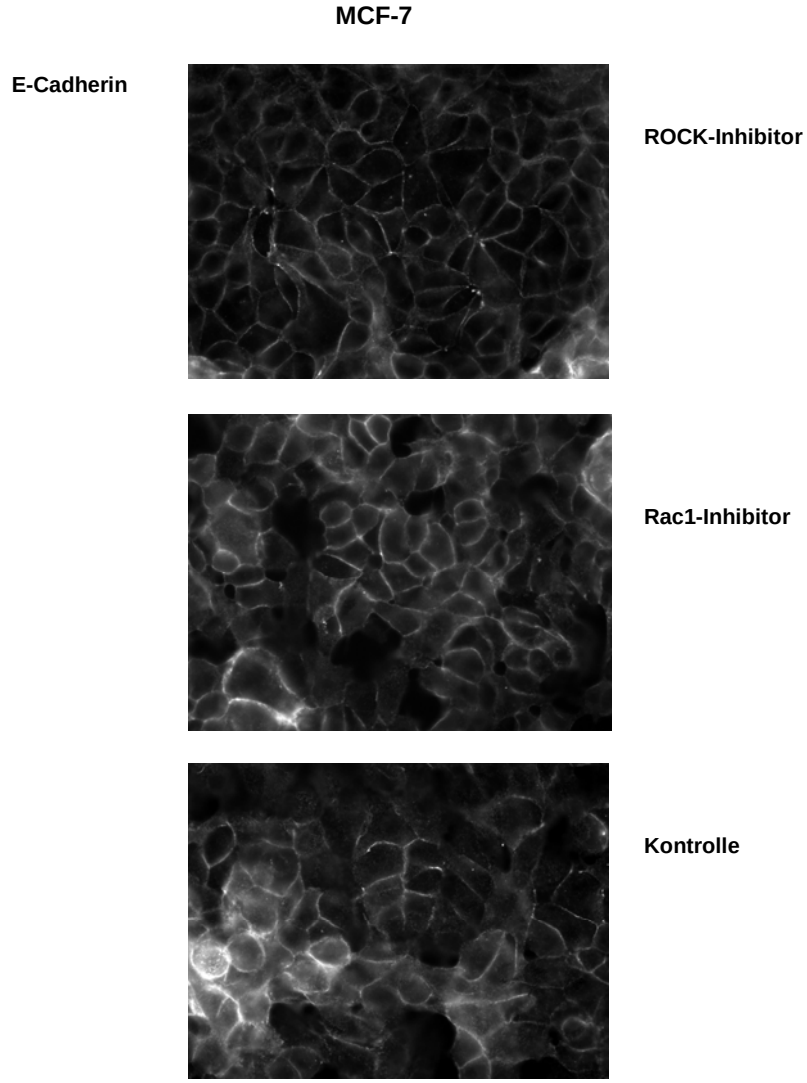


Abbildung 23: Immunfluoreszenz-Lokalisation von p120^{ctn} in MCF-7 Zellen nach Inhibierungder Rho-Kinase und von Rac1. Nach Inhibierung der Rho-Kinase (ROCK-Inhibitor) und von Rac1 (Rac1-Inhibitor) durch spezifische Inhibitoren wurden die Zellen mit Methanol-Aceton fixiert, bevor p120^{ctn} immunhistochemisch detektiert wurde. Die Aufnahmen wurden jeweils mit einem 63x-Objektiv gemacht. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen (n=2). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

Ähnlich verhielt es sich bei der Immunlokalisation von E-Cadherin. In den unbehandelten Kontroll-Zellen war das E-Cadherin-Signal als scharfe Linie an der Zellmembran zu beobachten, auch hier konnte ein Einfluss der Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1 beobachtet werden. Im Vergleich mit den unbehandelten Kontroll-Zellen wirkten die Bereiche der Zell-Zell-Adhäsion

verwischt, was auf eine verringerte Zellpolarität hinweist. Außerdem zeigten sich Unterschiede in der Signalintensität: Bei den mit ROCK-Inhibitor behandelten Zellen färbte sich E-Cadherin reproduzierbar schwächer an, als in den Zellen nach Inhibierung von Rac1 oder in den unbehandelten Kontroll-Zellen (Abbildung 24). Der Zellrasen der mit Rac1-Inhibitor behandelten Zellen zeigte außerdem zellfreie Areale, was auf eine geringere Proliferation oder erhöhte Apoptose der Zellen schließen lässt.

Die beschriebenen Veränderungen nach Applikation der Inhibitoren sind nicht durch unterschiedliche Zellzahlen bei der Aussaat zu begründen, da genau gleiche Zellzahlen ausplatiert wurden und zu Beginn der Inkubation mit Inhibitoren die Zelldichte kontrolliert wurde.



.

Abbildung 24: Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin in MCF-7 Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1. Nach Inhibierung der Rho-Kinase (ROCK-Inhibitor) und von Rac1 (Rac1-Inhibitor) durch spezifische Inhibitoren wurden die Zellen mit Methanol-Aceton fixiert, bevor E-Cadherin immunhistochemisch detektiert wurde. Die Aufnahmen wurden jeweils mit einem 63x-Objektiv gemacht. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen (n=2). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

In den unbehandelten Kontroll-Zellen war β-Catenin vornehmlich als scharf begrenzte Linie an der Zellmembran lokalisiert und befand sich damit genau wie $p120^{ctn}$ und E-Cadherin, im Bereich der Zell-Zell-Kontakte (Abbildung 25). Es war zu beobachten, dass das Signal für β-Catenin insgesamt schwächer war, wenn die

Zellen mit dem ROCK-Inhibitor behandelt worden waren. Es ergab sich für β-Catenin, im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen, auch keine scharfe Anfärbung im Bereich der Zell-Zell-Kontakte, sondern es fanden sich Areale, in denen kein Signal an der Zellmembran erkennbar war (großer Pfeil). Dies war, in abgemilderter Art und Weise, auch in den Zellen in denen Rac1 inhibiert worden war, erkennbar. Hier waren die Unterschiede, im Vergleich mit den unbehandelten Kontroll-Zellen zwar nicht so ausgeprägt, aber dennoch erkennbar: β-Catenin färbte sich nicht scharf begrenzt im Bereich der Zell-Zell-Grenzen an. Sowohl bei den unbehandelten Kontroll-Zellen, als auch bei den mit Inhibitoren behandelten Zellen konnte in einigen Zellen zusätzlich zur Anfärbung in Bereichen der Zell-Zell-Adhäsion auch ein intrazelluläres β-Catenin-Signal beobachtet werden (kleine Pfeile).

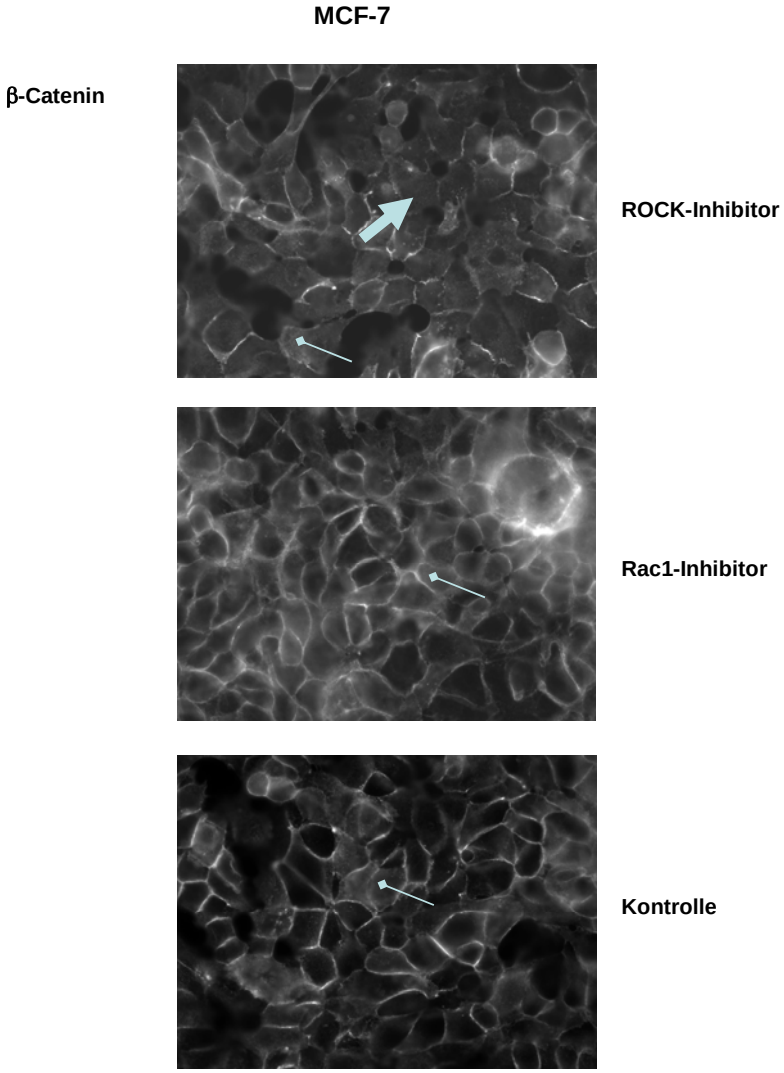


Abbildung 25: Immunfluoreszenz-Lokalisation von β-Catenin in MCF-7 Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1. Nach Inhibierung der Rho-Kinase (Rock-Inhibitor) und von Rac1 (Rac1-Inhibitor) durch spezifische Inhibitoren wurden die Zellen mit Methanol-Aceton fixiert, bevor β-Catenin immunhistochemisch detektiert wurde. Die Aufnahmen wurden jeweils mit einem 63x-Objektiv gemacht. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen (n=2). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

Aktin wurde mit Hilfe des Alkaloids Phalloidin gefärbt, das vor allem an filamentöses Aktin bindet. Diese waren in den unbehandelten Kontroll-Zellen als intrazelluläre Filamente erkennbar, die die Zellen durchzogen. Es zeigte sich jedoch auch ein schwächeres Signal unterhalb der Zellmembran, dass das

sogenannte subkortikale Aktin darstellt. Bei den mit Rho-Kinase- oder Rac1-Inhibitor behandelten Zellen ergab sich dahingegen ein anderes Bild (Abbildung 26). Aktin war nicht mehr als deutlich abgrenzbares intrazelluläres Filament erkennbar, während das subkortikales Aktin und eine diffuse intrazelluläres Signal zunahm.

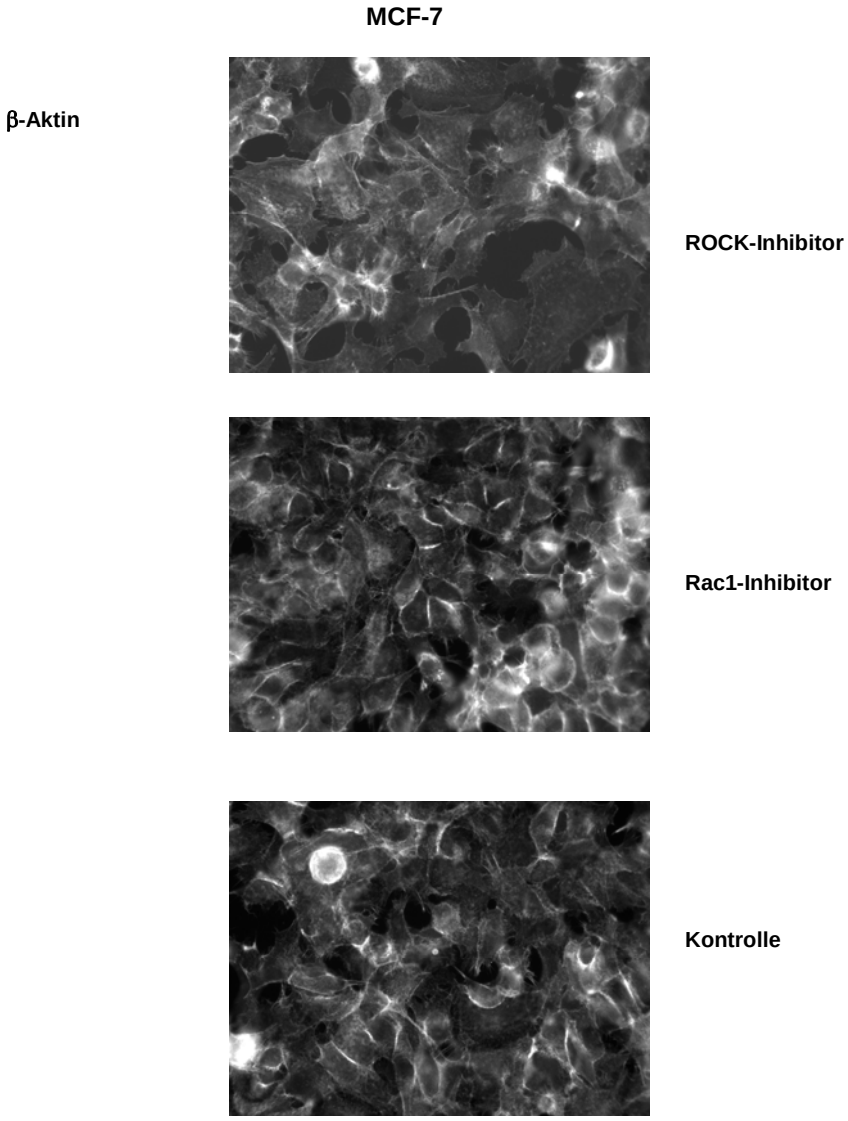


Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Lokalisation von β-Aktin in MCF-7 Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1. Nach Inhibierung der Rho-Kinase (ROCK-Inhibierung) und von Rac1 (Rac1-Inhibitor) durch spezifische Inhibitoren wurden die Zellen, mit Paraformaldehyd in PBS fixiert, sowie mit Triton X-100 permeabilisiert. Aktin-Filamente wurden unter Verwendung von Texas-Red-gekoppeltem Phalloidin angefärbt. Die Aufnahmen wurden jeweils mit einem 63x-Objektiv gemacht. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen (n=2). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

3.5.6 Immunfluoreszenz-Untersuchung nach Inhibierung der kleinen GTPasen Rho und Rac1 in PA-TU 8902

In der Immunfluoreszenz-Untersuchung der MCF-7 Zellen zeigte sich eine geringfügige Änderung in der Lokalisation der beiden Proteine E-Cadherin und $p120^{ctn}$ nach Inhibierung von Rho und Rac1. Es sollte nun in den PA-TU 8902 Zellen geklärt werden, ob dieses auch für sie zutrifft.

Zunächst fiel eine unterschiedliche Morphologie der beiden Zelllinien auf. Die MCF-7 Zellen hefteten sich gut ab und wuchsen als einschichtiger Zell-Monolayer in einer Ebene. Dadurch ergaben sich deutlich abgrenzbare Arealen der Zell-Zell-Grenzen, die gut in einer Immunlokalisation von Proteinen der Zell-Zell-Adhäsion angefärbt werden konnten. PA-TU 8902 Zellen zeigten dahingegen ein anderes Wachstumsverhalten in der Zellkultur. Sie hefteten sich weniger gut ab, zeigten einen rundlichen Phänotyp und wuchsen nicht als Monolayer, sondern innerhalb einer Kolonie, die in der Mitte mehrschichtig war. Das bedeutete, dass sich hier die Bereiche der Zell-Membran weniger scharf abgrenzen ließen und die dort befindlichen Proteine der Zell-Zell-Adhäsion nicht eindeutig lokalisiert werden konnten (Abbildung 6).

In den unbehandelten Kontroll-Zellen war $p120^{ctn}$ vor allem in der Zellmembran und in Bereichen der Zell-Zell-Kontakte lokalisiert. Nach Inhibierung der kleinen GTPasen ergaben sich geringe Unterschiede in der Lokalisation von $p120^{ctn}$. In den Zellen nach ROCK-Inhibierung erschien das $p120^{ctn}$-Signal stärker zu sein, wobei es auch Areale gibt, in denen die Zellen gar kein $p120^{ctn}$-Signal im Bereichen der Zell-Zell-Adhäsion erkennen ließen (große Pfeile). Des Weiteren gab es Zellen, die eine vermehrte intrazelluläre Anhäufung des Proteins zeigten (kleiner Pfeil).

Nach Inhibierung von Rac1 war $p120^{ctn}$ nicht in allen gezeigten Zellen als scharfe Linie in Bereichen der Zell-Zell-Adhäsion zu sehen sondern in manchen Zellen gar nicht (großer Pfeil) oder als unscharfes intrazelluläres Signal (kleiner Pfeil) (Abbildung 27). Dies kann zum einen durch das mehrschichtige Wachstum der PA-TU 8902 Zellen erklärt werden, die nicht nur in einer Ebene wachsen. Eine

andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass in den Zellen nach Inhibierung von Ra1c $p120^{ctn}$ eine Veränderung seiner Immunlokalisation erfährt und nicht mehr nur in Bereichen der Zell-Zell-Adhäsion zu finden ist.

In den unbehandelten Kontroll-Zellen war das E-Cadherin-Signal als scharfe Linie an der Zellmembran erkennbar. In den mit ROCK-Inhibitor behandelten Zellen zeigte die Immunlokalisation von E-Cadherin im Vergleich mit den unverändert gewachsenen Kontroll-Zellen ein ungeordneteres Zellwachstum mit größeren und unregelmäßigeren Zellen. Die Lokalisation von E-Cadherin schien dahingegen unverändert in Bereichen der Zell-Zell-Adhäsion zu sein. Die Immunlokalisation von E-Cadherin in den Zellen nach Inhibierung von Rac1 zeigte keine Unterschiede im Vergleich mit den unbehandelten Kontroll-Zellen (Abbildung 28).

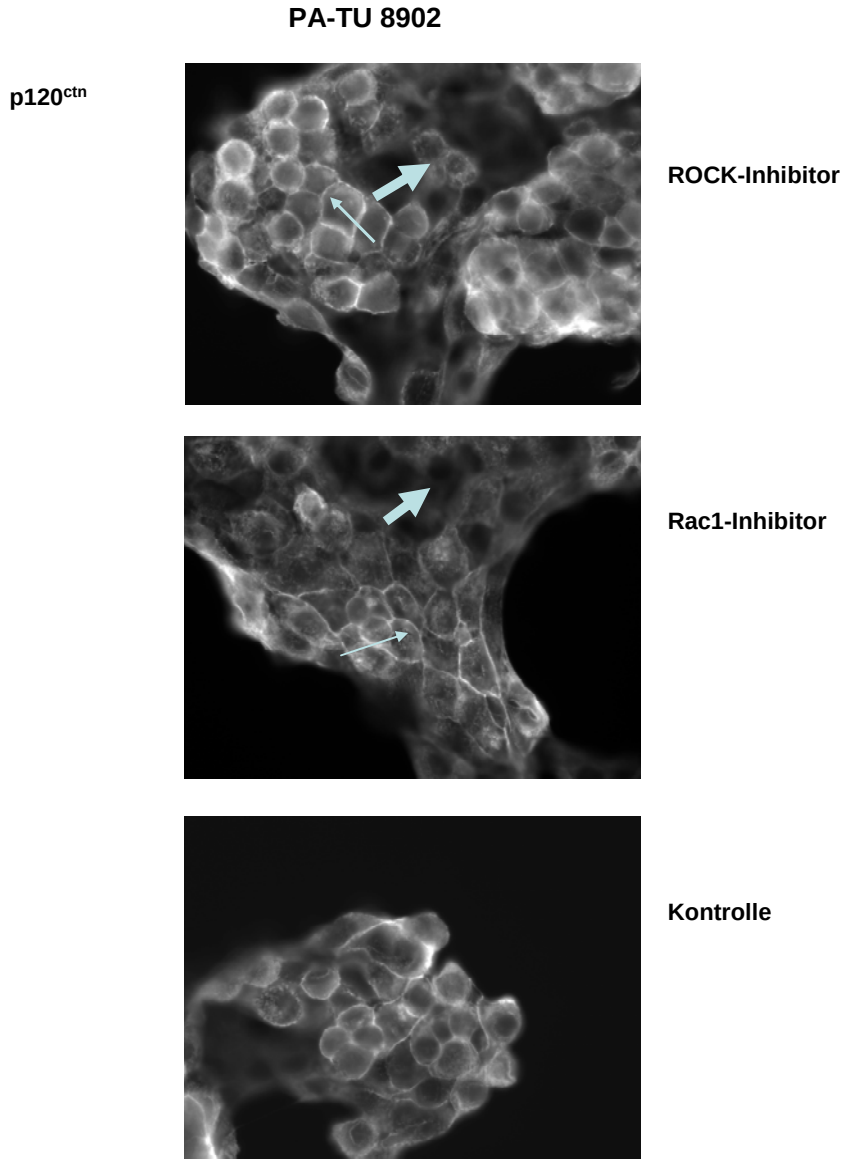


Abbildung 27: Immunfluoreszenz-Lokalisation von p120^{ctn} in PA-TU 8902 Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1. Nach Inhibierung der Rho-Kinase (ROCK-Inhibitor) und von Rac1 (Rac1-Inhibitor) durch spezifische Inhibitoren wurden die Zellen mit Methanol-Aceton fixiert, bevor p120^{ctn} immunhistochemisch detektiert wurde. Die Aufnahmen wurden jeweils mit einem 63x-Objektiv gemacht. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen (n=2). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

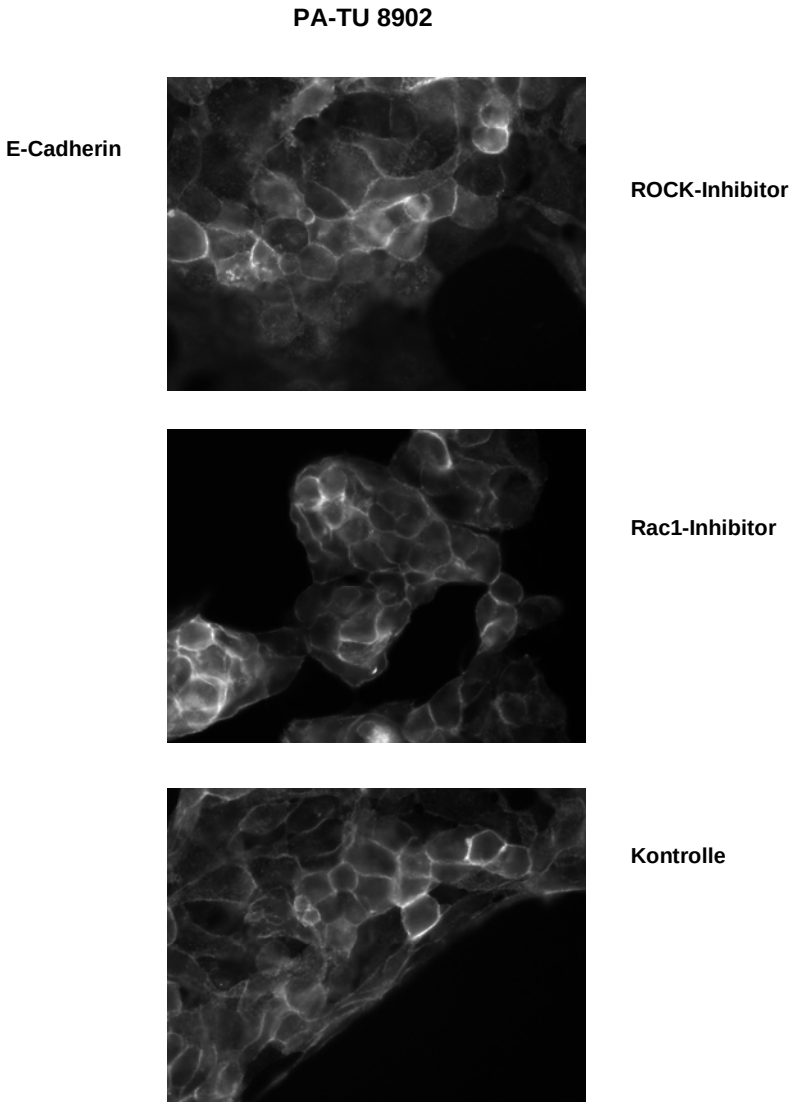


Abbildung 28: Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin in PA-TU 8902 Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1. Nach Inhibierung der Rho-Kinase (ROCK-Inhibitor) und von Rac1 (Rac1-Inhibitor) durch spezifische Inhibitoren wurden die Zellen mit Methanol-Aceton fixiert, bevor E-Cadherin immunhistochemisch detektiert wurde. Die Aufnahmen wurden jeweils mit einem 63x-Objektiv gemacht. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen (n=2). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

Sowohl bei den unbehandelten Kontroll-Zellen, als auch bei den Zellen, die mit Inhibitoren behandelt worden waren, befand sich β-Catenin überwiegend als scharf begrenzte Linie an der Zellmembran und somit im Bereich der interzellulären Adhäsionskomplexe (Abbildung 29).

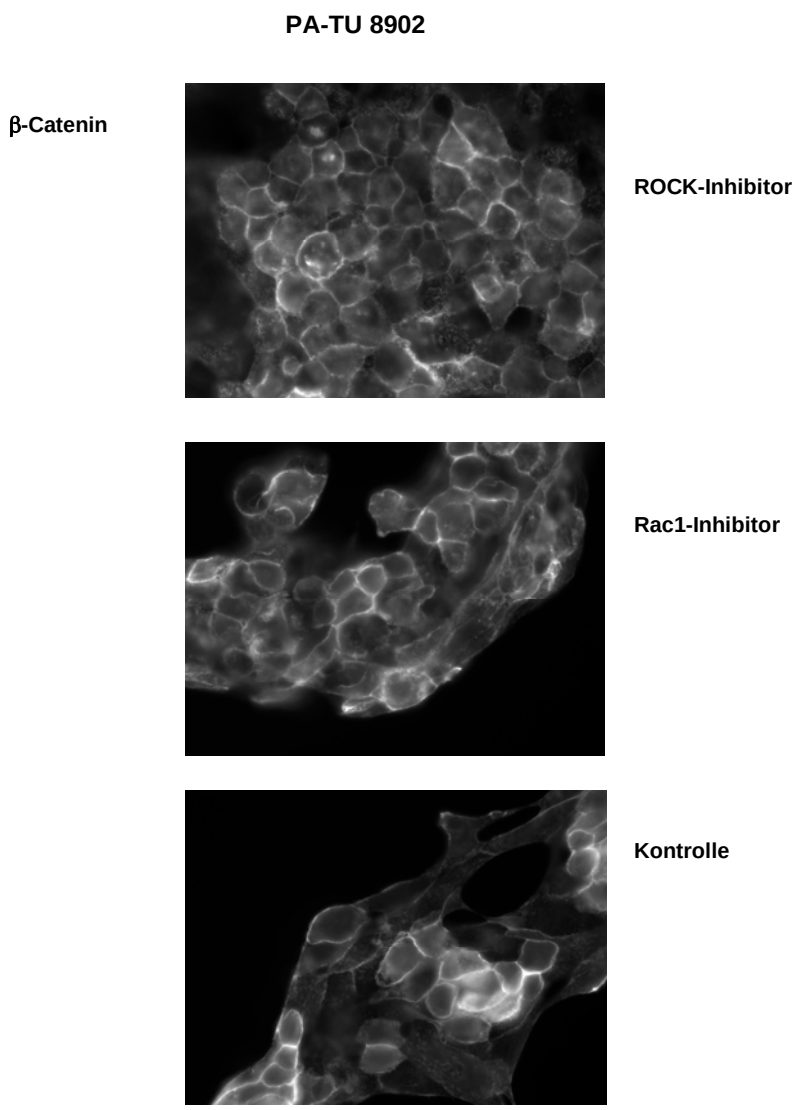


Abbildung 29: Immunfluoreszenz-Lokalisation von β-Catenin in PA-TU 8902 Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1. Nach Inhibierung der Rho-Kinase (ROCK-Inhibitor) und von Rac1 (Rac1-Inhibitor) durch spezifische Inhibitoren wurden die Zellen mit Methanol-Aceton fixiert bevor β-Catenin immunhistochemisch detektiert wurde. Die Aufnahmen wurden jeweils mit einem 63x Objektiv gemacht. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen (n=2). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

Aktin war in den unbehandelten Kontroll-Zellen als deutliches intrazelluläres und subkortikales Signal erkennbar. Die Aktin-Stress-Fasern durchziehen die ganze Zelle. Nach Inhibierung der Rho-Kinase oder von Rac1 wachsen die Zellen ungeordneter und das klar strukturierte Netzwerk aus Aktin-Fasern ist aufgehoben. Es ist nur noch ein diffuses Signal innerhalb der Zellen erkennbar.

Auch das Signal in Bereichen der Zell-Zell-Kontakte hat an Intensität verloren (Abbildungen 30).

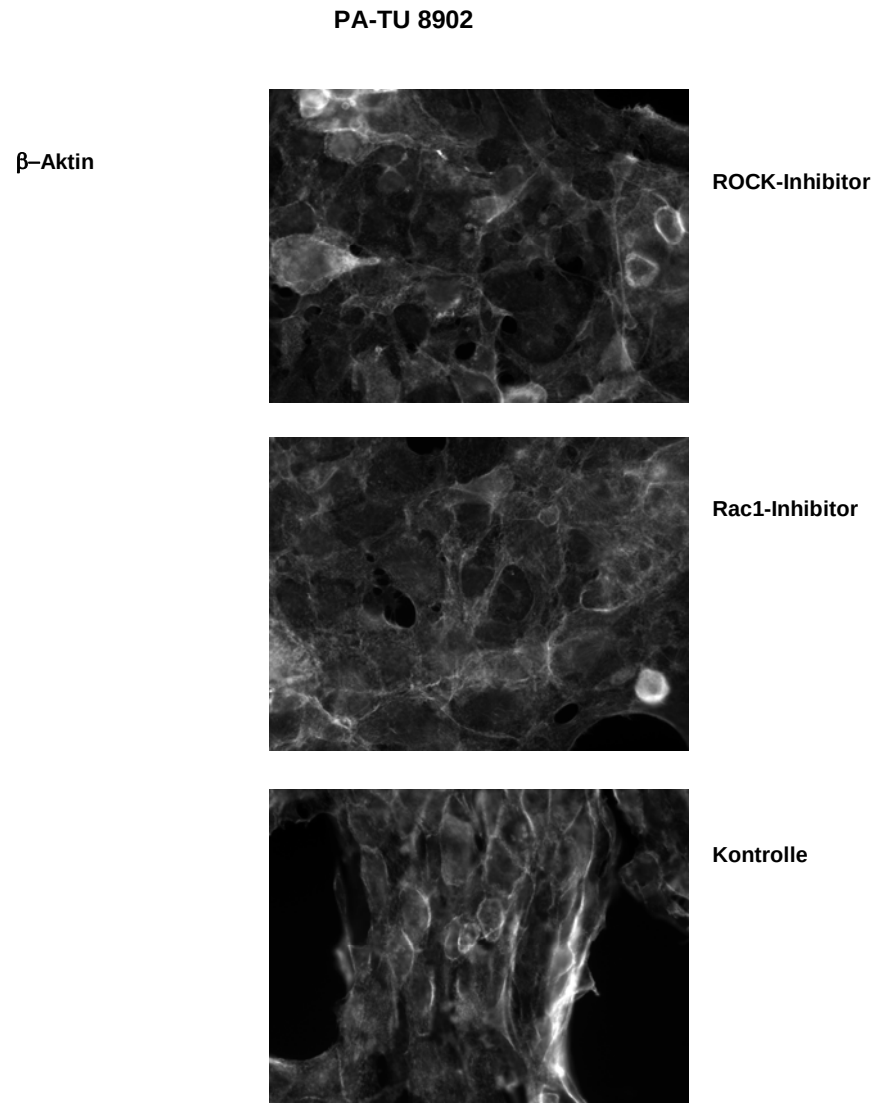


Abbildung 30: Immunfluoreszenz-Lokalisation von β-Aktin in PA-TU 8902 Zellen nach Inhibierung der Rho-Kinase und von Rac1. Nach Inhibierung der Rho-Kinase (ROCK-Inhibitor) und von Rac1 (Rac1-Inhibitor) durch spezifische Inhibitoren wurden die Zellen mit Paraformaldehyd in PBS fixiert, sowie mit Triton X-100 permeabilisiert. Aktin-Filamente wurden unter Verwendung von Texas-Red-gekoppeltem Phalloidin angefärbt. Die Aufnahmen wurden jeweils mit einem 63x Objektiv gemacht. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen (n=2). (ROCK=Rho-Kinase-Inhibitor, Rac1=*ras-relatet C3 botulinum toxin substrate 1*)

4 Diskussion

Es ist seit langem bekannt, dass invasiv wachsende Krebszellen eine reduzierte Zell-Zell-Adhäsion aufweisen. Besonders eine verminderte E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion konnte mit invasivem Wachstum und erhöhter metastatischer Potenz von Tumorzellen in Verbindung gebracht werden [55, 57]. Zur Entstehung von Metastasen müssen sich Krebszellen vom Primärtumor ablösen und in das umliegende Gewebe einwandern. Von dort aus können sie in den Blutkreislauf gelangen, sich in entfernten Geweben ablagern und dort zur Ausbildung von Metastasen führen [13, 24].

4.1. Die zelluläre $p120^{ctn}$-Konentration nimmt in MCF-7, MDA-MB 468 und PA-TU 8902 mit der Wachstumsdichte der Zellen zu

Seit einigen Jahren wird nun die Relevanz eines weiteren Proteins des E-Cadherin-Catenin-Komplexes für die Entstehung eines invasiven Phenotyps diskutiert. Dieses Protein, $p120^{ctn}$, gehört zur Subfamilie von Proteinen mit Armadillo-Domäne und wurde ursprünglich als Substrat der Proteinkinase *Src* identifiziert [42]. Sowohl epitheliale, als auch mesenchymale Zellen exprimieren unterschiedliche Isoformen in einem charakteristischen Verteilungsmuster. Über eine mögliche Regulation des Proteins ist noch wenig bekannt. Um den Einfluss von $p120^{ctn}$ in epithelialen Tumoren zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit zunächst Zellen mit unterschiedlicher Wachstumsdichte auf ihren Gehalt an $p120^{ctn}$ und weiteren Bestandteilen des E-Cadherin-Catenin-Komplexes untersucht. Hierbei kamen verschiedene Zelllinien aus Pankreas- und Brustkarzinomen zum Einsatz.

In den Brustkrebs-Zelllinien MCF-7und MDA-MB-468 und der Pankreas-Zelllinien PA-TU 8902 ist die zelluläre $p120^{ctn}$-Konzentration in den Zellen mit größerer Zelldichte deutlich erhöht, während die zelluläre E-Cadherin-Konzentration nur eine moderate Zunahme erkennen ließ. Mit Hilfe von Co-Immunpräzipitation ließ sich zeigen, dass in der Folge die zelluläre Menge des E-Cadherin-$p120^{ctn}$-Komplexes mit wachsender Zelldichte zunahm. Dies schlägt sich auch in einer leicht erhöhten Konzentration an E-Cadherin und den anderen Cateninen in Zellen

mit dichterem Wachstum nieder. Diese Zunahme war jedoch weitaus schwächer, als jene von $p120^{ctn}$.

Grosheva et al. konnten mit Überexpressionversuchen zeigen, dass in Geweben mit hoher Zelldichte die Bindungsmöglichkeiten von $p120^{ctn}$ an E-Cadherin abgesättigt sind und es nicht zu einer vermehrten $p120^{ctn}$-E-Cadherin-Bindung kommt. Entgegen diesen Beobachtungen konnte in der vorliegenden Arbeit aber eine Zunahme des mit E-Cadherin co-präzipitierten $p120^{ctn}$ in den Zellen mit hoher Zelldichte nachgewiesen werden. Es ist also in den untersuchten Karzinom-Zelllinien nicht nur mehr $p120^{ctn}$ vorhanden, es liegt auch verstärkt an E-Cadherin gebunden vor [22]. Die Daten legen den Schluss nahe, dass in den hier untersuchen Zellen nicht alle membranären E-Cadherin-Moleküle bzw. E-Cadherin-Catein-Komplexe $p120^{ctn}$ aufwiesen. Grosheva et al. erzielten diese Ergebnisse durch Überexpression von $p120^{ctn}$ in Fibroblasten und epithelialen Zellen aus Kanninchen und Hamster. Dies führt, verglichen mit einer endogenen $p120^{ctn}$-Konzentration, zu einer deutlichen höheren $p120^{ctn}$-Menge in diesen Zellen, was die Differenzen erklären könnte.

Aus den Arbeiten von Anastasiadis et al. ist bekannt, dass eine Überexpression von $p120^{ctn}$ deutliche Auswirkungen auf die Zell-Morphologie und -Motiliät hat [3]. Es entsteht ein *branching*-Phenotyp, der durch lange Fortsätze und Lamellopodien vor allem in Fibroblasten, aber auch in epithelialen Zellen gekennzeichnet ist. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden, obwohl die Konzentration von $p120^{ctn}$ in den dichter gewachsenen Zellen zunahm und daher auch von einer erhöhten intrazellulären $p120^{ctn}$-Konzentration ausgegangen werden kann. Allerdings wurden im Laufe dieser Arbeit auch keine Versuche mit Überexpression bestimmter Proteine gemacht.

Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich zusätzlich zu der vermehrten Bindung an E-Cadherin, auch eine erhöhte cytoplasmatische und nukleäre $p120^{ctn}$-Lokalisation ergibt. Es sollte auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass jenes $p120^{ctn}$, das vermehrt vorhanden ist, nicht so stabil an E-Cadherin gebunden ist.

In epithelialem Gewebe liegt der größte Anteil p120^{ctn} an E-Cadherin gebunden und membranständig vor. Diese Bindung ermöglicht oder verstärkt das laterale Cadherin-*Clustering*. Darunter versteht man die Aneinanderlagerung mehrer nebeneinander lokalisierter E-Cadherine der selben Zelle, die die Grundlage einer stabilen Zell-Zell-Adhäsion darstellen [3, 52, 64]. Desweiteren reguliert p120^{ctn} den Cadherin-*Turnovers* an der Zell-Oberfläche, in dem es die Endocytose und Degradation von E-Cadherin moduliert. Durch Bindung von p120^{ctn} an E-Cadherin wird der endocytotische Abbau von E-Cadherin verringert. Darüber hinaus ist bekannt, dass endocytierte E-Cadherin-p120^{ctn}-Komplexe vermehrt recycled werden, also an die Zellmebran zurücktransprotiert und nicht lysosomal degradiert werden. Dies schlägt sich in einer deutlich erhöhten Halbwertszeit der an p120^{ctn}-gebundenen E-Cadherine nieder [12, 25, 28, 61].

Laut dem von Anastasiadis et al. entworfenen Model der p120^{ctn}-E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion läuft diese Adhäsion in mehreren Stufen ab. Zunächst sind an der Plasmamembran E-Cadherin-Monomere vorhanden, die nicht mit den Aktin-Cytoskelett assoziiert sind. Während der Stufe I formieren sich laterale E-Cadherin-*cis*-Dimere, bevor in der Stufe II adhäsive *trans*-Dimere zwischen den Cadherinen benachbarter Zellen entstehen. Durch die Bindung von p120^{ctn} an diese adhäsiven Dimere wird schließlich das E-Cadherine-*clustering* bewirkt (Stufe III). Die Stufe IV dient der Quervernetzung mit dem Aktin-Cytoskelett [3]. In Übereinstimmung mit diesem Model könnte die Zunahme der zellulären p120^{ctn}-Konzentration in Zellen mit hoher Zelldichte, sowie die Zunahme des mit E-Cadherin co-präzipitierten p120^{ctn} also daran liegen, dass sich in Zellen mit dichtem Zellrasen die Stufe III der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion vollzieht und sich E-Cadherin-*cluster*, also stabile „Reisverschluss-ähnliche *adherens junctions*“ bilden.

4.2 Beeinflussung von p120^{ctn} durch extrazelluläres Calcium

Für die Aufrechterhaltung der sekundären und tertiären Struktur benötigen E-Cadherin Calcium. Darüber hinaus wirkt Calcium protektiv gegen proteolytische Degradation und ist notwendig für Proteinstabilität der E-Cadherine [30, 40]. Der Entzug von Calcium ermöglicht dadurch den Abbau durch Proteasen. Der E-

Cadherin-Komplex löst sich auf, die E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion nimmt ab und E-Cadherin wird internalisiert. Im Cytoplasma wird E-Cadherin proteolytisch abgebaut oder zurück an die Plasmamembran transportiert [28, 52, 54, 61]. Internalisiertes E-Cadherin kann an die Zellmembran zurückkehren, wenn $p120^{ctn}$ an endocytiertes E-Cadherin gebunden ist [12, 43, 62]. $p120^{ctn}$ dissoziiert während dieses Prozesses ab und kann im Cytosol oder im Kern vorliegen. E-Cadherin kann, so effektiv wie kein anderes Molekül, $p120^{ctn}$ an die Zellmembran rekrutieren [60].

Der Vergleich der $p120^{ctn}$-Konzentrationen bzw. der E-Cadherin-$p120^{ctn}$–Interaktionen in Zellen, die ohne extrazelluläres Calcium, in DMEM oder in Wachstumsmedium kultiviert wurden, ergab, dass die Gesamtkonzentration von $p120^{ctn}$ dadurch nicht wesentlich verändert wurde. In dem analysierten Zeitraum von 12 - 48 Stunden führte ein Entzug von Calcium nicht zur Degradation wesentlichen Mengen E-Cadherin oder $p120^{ctn}$ in den untersuchten Pankreas- bzw. Brustkarzinom-Zellen.

Zur Analyse der Menge von E-Cadherin-assoziiertem $p120^{ctn}$ wurde densitometrisch und rechnerisch die $p120^{ctn}$-Menge auf gleiche Mengen an eingesetztem E-Cadherin normalisiert. Dabei wurde klar, dass am wenigsten $p120^{ctn}$ gemeinsam mit E-Cadherin in den Zellen co-präzipitierte, die in Wachstumsmedium kultiviert worden waren, aber die größte $p120^{ctn}$-Menge in den Zellen nachzuweisen war, die in DMEM gewachsen waren. Die Menge an $p120^{ctn}$, welche aus den Zellen zu präzipitieren war, die die ganze Zeit in calciumfreiem Medium belassen worden waren, belegte einen mittleren Platz. Die co-präzipitierte $p120^{ctn}$-Menge war in den Zellen am geringsten, die nach Calcium-Entzug in Wachstumsmedium kultiviert worden waren (Abbildung 14).

Die Analyse der Menge des E-Cadherin-assoziierten $p120^{ctn}$ legt nahe, dass mit zunehmender Zelldichte mehr E-Cadherin-$p120^{ctn}$-Komplexe in den Zellmembranen zu finden waren. MCF-7 und PA-TU 8902 Zellen, die in DMEM kultiviert worden waren wiesen ebenfalls höhere Mengen co-präzipitierbarer E-Cadherin-$p120^{ctn}$-Komplexe auf, als Zellen die in Wachstumsmedium oder ohne Calcium gewachsen waren. Die erhöhte Menge E-Cadherin-$p120^{ctn}$-Komplexe

korreliert mit den Differenzierungszuständen der Zellen in DMEM, also einer stärkeren Polarisierung und einer regelmäßigeren Zellform. Während Zellen, die in Wachstumsmedium kultiviert worden waren, weniger E-Cadherin-p120^{ctn}-Komplexen aufweisen und eine Korrelation mit der Proliferation zeigen.

Calcium-Entzug bewirkt die Auflösung der *trans*-Bindung von E-Cadherin. Es findet aber intrazellulär keine Dissoziation der p120^{ctn}-E-Cadherin-Bindung statt. Passend zu diesen Beobachtung fanden Ivanov et al., dass E-Cadherin-Catenin-Komplexe inclusive p120^{ctn} durch einen extrazellulären Calcium-Entzug internalisiert werden. Dies wurde Clathrin-abhängigen Mechanismen zugeschrieben und soll auch für die Rückkehr des Komplexes an die Plasma-Membran bei normalisiertem extrazellulärem Calcium-Angebot verantwortlich sein [29].

Die Stimulation mit Wachstumsmedium bewirkt eine Proliferation der Zellen. Hierbei werden Zell-Zell-Kontakte kurzeitig aufgelöst, um Zellteilungen zu ermöglichen. Dies erklärt die Abnahme des zu co-präzipitierenden p120^{ctn} in diesen Zellen, im Vergleich zu den anderen Co-Immunpräzipitationen. Wie der Proteinnachweis im Gesamtlysat zeigte, ist nicht weniger p120^{ctn} in den Zellen nach Kultivierung in Wachstumsmedium vorhanden – es ist lediglich weniger an E-Cadherin gebunden. Andererseits könnte dieses Phänomen auch ein Hinweis darauf sein, dass Proliferation und die damit verbundene Auflösung von Zell-Zell-Kontakten eine Metastasierung von Tumoren begünstigt. Da ein geringerer Anteil von an E-Cadherin gebundenem p120^{ctn} sich auch auf die Stärke der interzellulären Adhäsion auswirkt.

Der Entzug von Calcium beeinflusst neben E-Cadherin auch p120^{ctn}; dieses Protein gelangt durch die Internalisierung von E-Cadherin ebenfalls ins Cytoplasma. Hier soll es, im Gegensatz zu den anderen Cateninen, auch ohne Bindung an E-Cadherin stabil sein [28, 52, 54, 61]. Allerdings geht nach einer Studie von Bellovin et al. cytoplasmatisches p120^{ctn} mit einer gesteigerten Invasivität und einer schlechteren Prognose einher [5]. Auch Thoreson et al. konnte zeigen, dass in 15% der untersuchten Pankreaskarzinome kein p120^{ctn} nachweisbar war und es in 25% cytoplasmatisch vorlag [53]. In der vorliegenden

Arbeit ist jedoch eine geringere Menge $p120^{ctn}$ im Gesamtlysat in den Zellen nach Calcium-Entzug und somit nach Internalisierung von E-Cadherin zu beobachten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Komplex aus E-Cadherin und $p120^{ctn}$ einer Regulation in epithelialen Zellen unterliegt. Eine Kultivierung der Zellen in DMEM bewirkte eine vermehrte Bindung von $p120^{ctn}$ an E-Cadherin und lässt die Zellen differenzieren, was mit einer vermehrten Bildung an Zell-Zell-Kontakten einhergeht. Die Kultivierung der Zellen in Wachstumsmedium verringerte dahingegen die Menge an $p120^{ctn}$ die mit E-Cadherin zu präzipitieren war.

4.3 Tyrosin-Phosphorylierung von $p120^{ctn}$

Verschiedene Funktion von $p120^{ctn}$ werden durch Phosphorylierung reguliert [3, 25, 44]. Die nähere Untersuchung der Effekte einer $p120^{ctn}$-Phosphorylierung hat sich aber als schwierig erwiesen, da das Protein an zahlreichen Tyrosin- und Serin-/Threonin-Stellen phosphoryliert werden kann. Nahezu alle dieser Phosphorylierungsstellen liegen innerhalb der N-terminalen Regulator-Domäne von $p120^{ctn}$, die 325 Aminosäuren umfasst [43].

Die bisher veröffentlichten Daten legen nahe, dass die Phosphorylierung einzelner Tyrosine die Affinität von $p120^{ctn}$ für E-Cadherin erhöht und damit zu Stabilisierung des E-Cadherin-Adhäsionskomplexes sowie der zellulären Adhäsion führt [43]. Aufbauend auf diesen Informationen bezüglich der $p120^{ctn}$-Phosphorylierung, sowie den eigenen Ergebnissen aus den Vorversuchen, wurden nun einige Tyrosin-Phosphorylierungsstellen untersucht. Hierfür wurden PA-TU 8902 Zellen über Nacht in einem calciumfreien Medium kultiviert. Bei einem Ansatz wurde das nach 12 Stunden durch DMEM ersetzt, während der andere Ansatz in Wachstumsmedium kultiviert wurde. Zwei weitere Ansätze wurden in calcium-freiem Medium belassen.

4.3.1 Tyrosin-Phosphorylierung von p120^{ctn} an Tyrosin-Rest Y228 und Y280

Alle der verschieden behandelten PA-TU 8902 Zellen wiesen eine Phosphorylierung am Tyrosin-Rest Y228 auf, während am Tyrosin-Rest Y280 in keinem Versuchsansatz eine Phosphorylierung nachweisbar war. Hierbei ist anzumerken, dass eventuell doch eine Tyrosin-Phosphorylierung in den Zellen vorgelegen hat, diese jedoch aufgrund einer raschen Dephosphorylierung bereits wieder abgeklungen war.

Aus der Arbeit von Castano et al. ist bekannt, dass sich die Affinität von p120^{ctn} für RhoA erhöht, wenn es am Tyrosin-Rest Y228 durch das Onkogen *Src* phosphoryliert wird [10]. Mariner et al. konnten feststellen, dass dieser Tyrosin-Rest in A431 Zellen nach EGF-Stimulation phosphoryliert wird und sich das phosphorylierte p120^{ctn} an *Adherens Junctions* und Lamellopodien ansammelt [33]. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass der Tyrosin-Rest Y228 in einigen hoch-malignen Zellen konstitutiv phosphoryliert ist. Die eigenen Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass der Tyrosin-Rest Y228 in der Pankreaskazinom-Zelllinie PA-TU 8902 generell in phosphorylierter Form vorliegt und nicht mit der Funktionalität des E-Cadherin-Komplexes korreliert. Calcium-Entzug bewirkt die Auflösung der E-Cadherin *trans*-Bindung, führt jedoch nicht zu einer Dissoziation der E-Cadherin-p120^{ctn}-Bindung. Hierzu passt, dass die Phosphorylierung an Tyrosin-Rest Y228 nicht verändert ist, da eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung an Tyrosin Y228 mit einer Dissoziation dieser beiden Proteine korreliert.

4.3.2 Tyrosin-Phosphorylierung von p120^{ctn} an Tyrosin-Rest Y291

In den Zellen, die in calciumfreiem Medium kultiviert worden waren, sowie in den Zellen, die mit dem Wachstumsfaktor EGF stimuliert worden waren, konnte keine Phosphorylierung am Tyrosin-Rest Y291 beobachtet werden. Lediglich in den Zellen, die nach Calcium-Entzug mit Calcium stimuliert wurden, in Form von DMEM oder Wachstumsmedium, konnte eine Tyrosin-Phosphorylierung an Tyrosin Y291 beobachtet werden.

Interessanterweise konnte in diesem Versuchsansatz eine durch Calcium-Zugabe induzierte E-Cadherin *trans*-Bindung mit einer verstärkten Phosphorylierung von $p120^{ctn}$, genauer an Tyrosin Y291, korreliert werden. Diese Daten legen nahe, dass eine durch Calcium induzierte E-Cadherin-Ligation durch Bindung von Kinasen, wie der FER- oder Fyn-Kinase, zu einer verstärkten Phosphorylierung von $p120^{ctn}$ in Position Y291 führt. Diese Modifikation von $p120^{ctn}$ könnte eine Vorraussetzung zur Stabilisierung des E-Cadherin-Adhäsionskomplexes oder zur lateralen E-Cadherin-E-Cadherin Assoziation darstellen. Besonders letztere wird durch $p120^{ctn}$ positiv gefördert [52]. Dabei scheint diese Phosphorylierung nicht abhängig von einem erfolgreichen Aufbau des Adhäsionskomplexes zu sein, da auch die Stimulation mit Wachstumsmedium die Y291-Phosphorylierung verstärkte aber nicht zu einer Zunahme der $p120^{ctn}$-E-Cadherin-Interaktion führte (in Abbildung 15 beschrieben).

4.3.3 Tyrosin-Phosphorylierung von $p120^{ctn}$ an Tyrosin-Rest Y96

Der Tyrosin-Rest Y96 war in den Zellen phosphoryliert, die in calciumfreiem Medium gewachsen waren, sowie auch in den Zellen, aus calciumfeiem Medium nach Stimulation mit EGF. Auffällig ist, dass das Molekulargewicht dieser $p120^{ctn}$-Isoform mit fast 130 kDa größer ist, als bei den vorher beschriebenen. Dieses ist unter anderem damit zu erklären, dass $p120^{ctn}$ verschiedene Start-Codons aufweist und das Y96 nur in den langen Isoformen zu finden ist [43]. Darüber hinaus gibt es in der Literatur Hinweise, dass die großen $p120^{ctn}$-Isoformen vor allem in mesenchymalen Zellen zu finden sind und die Migration der Zellen fördern.

Durch die Phosphorylierung an Tyrosin-Resten wird generell die Affinität von $p120^{ctn}$ für E-Cadherin gesteigert und die Zell-Zell-Adhäsion verbessert [43]. Durch Calcium-Entzug wird die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion geschwächt, während durch die Phosphorylierung von $p120^{ctn}$ an Tyrosin-Resten die Affinität des Proteins für E-Cadherin erhöht wird. Die Phosphorylierung könnte also zum Ziel haben, die Verankerung des noch an der Membran-befindlichen E-Cadherins besser zu stabilisieren, um die interzelluläre Adhäsion trotz des Calcium-Defizits aufrechterhalten zu können. Die Phosphorylierung an Tyrosin Y96 korreliert mit

der Auflösung von Zell-Zell-Kontakten durch den Entzug von Calcium. Ihm könnte somit eine wichtige Rolle für die Modulation von calciumabhängigen Zell-Zell-Kontakten zukommen. $p120^{ctn}$ kann an alle klassischen Cadherine binden. Die Phosphorylierung von $p120^{ctn}$ kann somit auch von $p120^{ctn}$ welches an N-Cadherin gebundenen ist stammen, obwohl E-Cadherin das vorherrschende Cadherin in den PA-TU 8902 Zellen ist.

4.3.4 Tyrosin-Phosphorylierung an Tyrosin-Rest Y96 in Abhängigkeit unterschiedlicher Konfluenz

Um eine mögliche Funktion von Tyrosin-Rest Y96 in der Regulation des E-Cadherin-Komplexes weiter zu verifizieren, wurde die Phosphorylierung an Tyrosin Y96 in Abhängigkeit einer unterschiedlichen Konfluenz untersucht. Hierfür wurden PA-TU 8902 Zellen unterschiedlich dicht ausgesät und für 12 Stunden durch eine Kultivierung in DMEM-Zellkulturmedium synchronisiert. Anschließend wurde eine Zellkulturschale für eine Stunde mit Orthovanadat inkubiert, während die andere unverändert in DMEM kultiviert wurde. Orthovanadat verlangsamt die Abnahme der Tyrosin-Phosphorylierung durch Inhibierung verschiedener Tyrosinphosphatasen, so dass diese messbar wird. Hierbei ist zu beachten, dass bei den mit Orthovanadat stimulierten Zellen, im Gegensatz zu den unstimulierten Kontroll-Zellen, nur die Kinase-Aktivität gemessen wird, da die Phosphatase-Aktivität durch einen externen Inhibitor gehemmt wurde.

In den unbehandelten Kontroll-Zellen war die Phosphorylierung des Tyrosin-Rests Y96 in den superkonfluent gewachsenen Zellen stärker, als in den weniger dicht gewachsenen Zellen. Die Regulationsmechanismen sind durch dichter wachsende Zellen und vermehrte Zell-Zell-Kontakte in Richtung einer erhöhten Phosphorylierung des Tyrosin-Restes Y96 verschoben worden. Da diese Zellen aber vermehrt E-Cadherin-$p120^{ctn}$ Komplexe aufwiesen, kann die erhöhte Phosphorylierung an Tyrosin Y96 in Zellen die ohne Calcium inkubiert worden waren, nicht in direktem Zusammenhang mit einer Dissoziation der E-Cadherin-$p120^{ctn}$-Bindung stehen. In der Co-Immunpräzipitation war mehr $p120^{ctn}$ gemeinsam mit E-Cadherin zu präzipitieren wenn die Zellen dichter gewachsen waren. Dies könnte auf einen erhöhten *turn-over* der E-Cadherin-$p120^{ctn}$-

Komplexe hinweisen, die mit einer verstärkten Phophorylierung am Tyrosin-Rest Y96 in den superkonfluent gewachsenen Zellen korreliert.

In den mit Orthovanadat stimulierten Zellen zeigte sich dahingegen ein anderes Bild: hier wiesen die subkonfluent gewachsenen Zellen eine stärkere Tyrosin-Phosphorylierung an Tyrosin Y96 auf. Orthovanadat inhibiert die Phosphatasen und verstärkt auf diesem Weg die Tyrosin-Phosphorylierung. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in subkonfluent gewachsenen Zellen eine höhere Phosphataseaktivität vorliegt, als in superkonfluent gewachsene Pankreaskarzinom-Zellen.

4.4 Einfluss von p120^{ctn} auf die kleinen GTPasen Rho und Rac1

Mitglieder der Familie der kleinen GTPasen sind die Hauptregulatoren des Aktin-Cytoskeletts [8, 23]. p120^{ctn} kann nach bisherigem Kenntnisstand nur mit Rho-GTPasen interagieren, wenn es cytoplasmatisch vorliegt [4, 5, 36, 44]. Im Cytoplasma kommt es aufgrund der Interaktion von p120^{ctn} mit den kleinen GTPasen zu einer erniedrigten RhoA-Aktivität sowie zu einer gesteigerten Aktivität von Rac1 und Cdc42, was eine erhöhte Motilität der Zellen zur Folge hat [22, 36, 59].

In dieser Arbeit sollte durch spezifische Inhibitoren des Rho-Kinase Signalweges (ROCK-Inhibitor) und der Rac1-GTPase die Rückkopplungen der Rho-/Rac-Signalwege auf den E-Cadherin-Komplex analysiert werden.Hierfür wurden PA-TU 8902 und MCF-7 Zellen zu 60% konfluent ausgesät, bevor am nächsten Tag ein Medienwechsel vorgenommen wurde. Eine Stunde später wurden die ROCK- und Rac1-Inhibitoren hinzugegeben. Es wurden Zeiträume von 6 und 12 Stunden nach Hinzugabe der Inhibitoren untersucht.

In der Co-Immunpräzipitation mit p120^{ctn} co-präzipitierte mehr E-Cadherin in den Zellen, die mit dem ROCK- oder dem Rac1-Inhibitor behandelt worden waren. Es liegt somit in den Zellen nach Inhibierung der kleinen GTPasen eine größere Menge E-Cadherin-Komplex vor. Es ist überraschend, dass nach Inhibierung von Rac1, welche eine Inhibierung der Assoziation des E-Cadherin-Komplexes mit dem Aktin-Cytoskeltt nach sich zieht, die größte Menge p120^{ctn} mit E-Cadherin co-

präzipitiert werden konnte. Eine solche Inhibierung verhindert auch die Assoziation des E-Cadherin-Komplexes mit dem Aktin-Cytoskelett, für die Rac1 notwendig ist [8, 23]. Die Interaktion von $p120^{ctn}$ mit E-Cadherin benötigt also keine Bindung an das Aktin-Cytoskelett.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zeigen, dass die Bindung von $p120^{ctn}$ an E-Cadherin sehr komplex reguliert ist. Neben den verschiedenen $p120^{ctn}$-Isoformen ist die Phosphorylierung an verschiedenen Tyrosinen von großer Bedeutung. Die hier erhobenen Daten weisen in Pankreas- und Brustkarzinom-Zellen den Tyrosine Y291 und Y96 eine besondere Bedeutung zu. Die näheren Zusammenhänge müssen in weiteren Arbeiten analysiert werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von p120-Catenin ($p120^{ctn}$) auf die Zell-Zell-Adhäsion in humanen Karzinom-Zelllinien. Es gibt Hinweise darauf, dass $p120^{ctn}$ direkt die Stärke der E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion beeinflusst und $p120^{ctn}$-delitäre Karzinome eine erhöhte metastatische Potenz aufweisen.

In den Brustkrebs-Zelllinien MCF-7und MDA-MB-468 und der Pankreas-Zelllinien PA-TU 8902 wurde mit Hilfe proteinbiochemischer Methoden der Einfluss der Zelldichte sowie der Ausbildung des Aktinzytoskeletts auf die Assoziation von $p120^{ctn}$ mit E-Cadherin untersucht. Die zelluläre $p120^{ctn}$-Konzentration stieg mit wachsender Zelldichte deutlich an. In allen untersuchten Zellinien co-präzipitierte $p120^{ctn}$ gemeinsam mit E-Cadherin. Mit steigender Zelldichte konnte gezeigt werden, dass eine höhere Menge $p120^{ctn}$ mit E-Cadherin co-präzipitiert. Die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakte läuft in mehreren Stufen ab, wobei aus E-Cadherin Monomeren Dimere werden. Da erst durch die Bindung von $p120^{ctn}$ an E-Cadherin-Dimere das für eine stabile Adhäsion notwendige Cadherine-*clustering* erfolgen kann, ist die Zunahme der $p120^{ctn}$-Konzentration als Hinweis auf eine gesteigerte Ausbildung von ausgedehnten Zell-Zell-Kontakten zu deuten.

Um die Mechanismen zu analysieren, die zur Bildung der E-Cadherin-$p120^{ctn}$-Komplexe führen, wurden durch Calcium-Entzug und –zugabe koordiniert die E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte aufgelöst und wieder rekonstruiert. Bei der Untersuchung der Auswirkungen eines Calcium-Entzuges auf die Assoziation von E-Cadherin mit intrazellulärem $p120^{ctn}$ konnte festgestellt werden, dass Calcium-Entzug keine Dissoziation der $p120^{ctn}$-E-Cadherin-Bindung bewirkt.

Die Funktion von $p120^{ctn}$ wird entscheident durch die Phosphorylierung an Tyrosin-Resten reguliert. In den PA-TU 8902 Zellen liegt der Tyrosin-Rest Y291 sowohl in differenzierten, als auch in proliferierenden Zellen phosphoryliert vor.

Der Tyrosin-Rest Y96 war dahingegen nur in den Zellen phosphoryliert, die in Calcium-freiem Medium gewachsen waren und korreliert somit mit der Auflösung der E-Cadherin-Kontakte durch den Entzug von Calcium. Calcium-Entzug schwächt die Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion, während die Tyrosin-Phosphorylierung von $p120^{ctn}$ die Affinität des Proteins für Cadherine erhöht. Die Phosphorylierung an Tyrosin Y96 und eine damit verbundene stabilere Bindung an E-Cadherin könnte bewirken, dass die interzelluläre Adhäsion nach Calcium-Zugabe schneller wieder aufgebaut werden kann. Diesem Tyrosin-Rest könnte somit eine wichtige Rolle für die Modulation von E-Cadherin-abhängigen Zell-Zell-Kontakten zukommen.

Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen sind Hauptregulatoren des Aktin-Cytoskeletts und werden ihrerseits durch $p120^{ctn}$ in ihrer Aktivität beeinflusst. Sowohl nach einer Inhibierung der Rho-Kinase, als auch von Rac1, war in MCF-7 und PA-TU 8902 Zellen mehr E-Cadherin an $p120^{ctn}$ gebunden, während E-Cadherin in MCF-7 Zellen gleichzeitig in geringerem Maße mit dem Aktin-Cytoskelett assoziiert war. Dies legt den Schluss nahe, dass die Interaktion dieser beiden Proteine keiner Bindung an das Aktin-Cytoskelett bedarf. Darüber hinaus scheint sich eine verringerte Rac1-Aktivität stabilisierend auf $p120^{ctn}$ und E-Cadherin auszuwirken.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weisen $p120^{ctn}$ vielfältige Regulationsmöglichkeiten der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion in epithelialen Zellen zu, deren genauen Zusammenhänge in weiteren Arbeiten zu klären sind.

6 Literaturverzeichnis

1 **Aho S, Levänsuo L, Montonen O, Kari C, Rodeck U, Uitto J:**
Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of is multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells.
J Cell Sci 115: 1391-1402, 2002

2 Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mariner DJ, Crawford HC, Zheng Y, Reynolds AB:
Inhibition of RhoA by p120 catenin.
Nat Cell Biol 2: 637-644, 2000

3 Anastasiadis PZ, Reynolds AB:
The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer.
J Cell Sci 113: 1319-1334, 2000

4 Anastasiadis PZ, Reynolds AB:
Regulation of Rho GTPases by p120 catenin.
Cur Opin Cell Biol 13: 604-610, 2001

5 Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM:
Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for agressive disease.
Cancer Res 65: 10938-10945, 2005

6 Birchmeier W, Beherens J:
Cadherin expression in carcinomas: role in the fromation of cell junctions and the prevention of invasiveness.
Biochim Biophys Acta 1198: 11-26, 1994

7 Bishop AL., Hall A:
Rho GTPase and their effector proteins.
Biochem J 348: 241-255, 2000

8 Braga VM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA:
The small GTPases Rho Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts.
J Cell Biol 137: 1421-143, 1997

9 Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno I:
GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo.
Bioessays 29: 356-370, 2007

10 Castano J, Solanas G, Casagolda D, Raurell I, Villagrasa P, Bustelo XR, Garcia de Herreros A, Dunach M:
Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA.
Mol Cell Biol 27: 1745-1757, 2007

11 Ciesiolka M, Delvaeye M, van Imschoot G, Verschuere V, McCrea P, van Roy F, Vleminckx K:
p120 catenin is required for morphogenetic movements involved in the formation of the eyes and the craniofacial skeleton in *Xenopus*.
J Cell Sci 117: 4325-4339, 2004

12 Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB:
A core function for p120-catenin in cadherin turnover.
J Cell Biol 163: 525-534, 2003

13 DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA:
AGA technical review on the epidemiology, dignosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma.
Gastoenterology 117: 1464-1484, 1999

14 Downing JR, Reynolds AB:
PDGF, CSF-1, and EGF induce tyrosine phosphorylation of p120, a $pp60^{src}$ transformation-associated substrate.
Oncogene 6: 607-613, 1991

15 Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI:
α-Catenin is a molecular switch that binds E-Cadherin-β-Catenin and regulates Actin-Filament assembly.
Cell 123: 903-915, 2005

16 Etienne-Manneville S, Hall A:
Rho GTPases in cell biology.
Nature 420: 629-635, 2002

17 Franz CM, Ridley AJ:
p120 catenin associates with microtubules.
J Biol Chem 279: 6588-6594, 2004

18 Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W:
E-Cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells.
J Cell Biol 113: 173-185, 1991

19 Freelove R, Walling, AD:
Pancreatic cancer: diagnosis and management.
Am Fam Physician 73: 485-492, 2006

20 Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut, Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends.
5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, 2006

21 Giehl K:
Oncogenic Ras in tumor progression and metastasis.
Biol Chem 386: 193-205, 2005

22 Grosheva I, Shtutmann M, Elbaum M, Bershadsky AD:
p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell- cell contact formation and regulation of cell locomotion.
J Cell Sci 114: 695-707, 2000

23 Hall A:
Rho GTPases and the control of cell behavior.
Biochem Soc Trans 33: 891-895, 2005

24 Hanahan D, Weinberg RA:
The Hallmarks of Cancer.
Cell 100: 57-70, 2000

25 Hatzfeld M:
The p120 family of cell adhesion molecules.
Euro J Cell Biol 84: 205-214, 2005

26 Hay ED:
An overwiev of epithelio-mesenchymal transformation.
Acta Anat 154: 8-20, 1995

27 Huber AH, Nelson WJ, Weis WI:
Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of β-Catenin.
Cell 90: 871-882, 1997

28 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:
A novel role for p120 catenin in E-cadherin function.
J Cell Biol 159: 465-476, 2002

29 Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA:
Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by clathrin-mediated pathways into a unique storage compartment.
Mol Biol Cell 15: 176-186, 2004

30 Kemler R:
From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion.
Trends Genet 9: 317-321, 1993

31 Kern S, Hruban R, Hollingsworth MA, Brand R, Adrian TE, Jaffee E, Tempero MA:
A White Paper: The product of a pancreas cancer think tank.
Cancer Res 61: 4923-4932, 2001

32 Maeda M, Johnson KR, Wheelock M:
Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition.
J Cell Sc 118: 873-887, 2005

33 Mariner DJ, Davis MA, Reynolds AB:
EGFR signaling to p120-catenin through phosphorylation at Y228.
J Cell Sci 117: 1339-1350, 2003

34 Nagafuchi A:
Molecular architecture of adherens junctions.
Curr Op Cell Biol 13: 600-603, 2001

35 Niessen CM, Yap AS:
Another job for the talented p120-Catenin.
Cell 127: 875-877, 2006

36 Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B:
p120 Catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases.
J Cell Biol 150: 567-579, 2000

37 Ozawa M, Kemler R:
The membrane-proximal region of the E-Cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity.
J Cell Biol 142: 1605-1613, 1998

38 Park J, Kim SW, Lyons JP, Ji H, Nguyen TT, Cho K, Barton MC, Deroo T, Vleminckx K, McCrea PD:
Kaiso/p120-Catenin and TCF/β-Catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets.
Dev Cell 8: 843-854, 2005

39 Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, Liu D, Hirano S, Takeichi M, Klöppel G, Lemoine NR:
Loss of membranous E-Cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advances stage.
J Pathol 174: 243-248, 1994

40 Pokutta S, Weis WI:
Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts.
Annu Rev Cell Dev Biol 23: 237-61, 2007

41 Radisky DC:
Epithelial-mesenchymal transition.
J Cell Sci 118: 4325-4326, 2005

42 Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z:
Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120^{cas} associates with E-Cadherin complexes.
Mol Cell Biol 14: 8333-8342, 1994

43 Reynolds AB, Roczniak-Ferguson A:
Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer.
Oncogene 23: 7947-7956, 2004

44 Reynolds AB:

p120-catenin: past and present.
Biochim Biophys Acta 1773: 2-7, 2007

45 Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K:
Kompendium Internistische Onkologie, 4. Auflage
Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2006
ISBN-10 3-540-20657-4

46 Seidel B, Braeg S, Adler G, Wedlich D, Menke A:
E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120^{ctn} isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells.
Oncogene 23: 5532-5542, 2004

47 Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grübel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA:
Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins.
Nature 374: 327-337, 1995

48 Shibata T, Kokubu A, Sekine S, Kanai Y, Hirohashi S:
Cytoplsamic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-Cadherin-deficient breast cancer.
Am J Pathol 164: 2269-2278, 2004

49 Spring CM, Kelly KF, O'Kelly I, Graham M, Crawford HC, Daniel JM:
The catenin p120^{ctn} inhibits Kaiso-mediated transcripitional repression of the β-catenin/TGF target gene *matrilysin*.
Ex Cell Res 305: 253-265, 2005

50 Takeichi M:
Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator.
Science 251: 1451-1455, 1991

51 Thiery JP:
Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.
Nat Rev Cancer 2: 442-454, 2002

52 Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hummingbird DK, Reynolds AB:
Selective uncoupling of p120^{ctn} from E-Cadherin disrupts strong adhesion.
J Cell Biol 148: 189-201, 2000

53 Thoreson MA, Reynolds AB:
Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implication for tumor progression.
Differentiation 70: 583-589, 2002

54 van Hengel J, van Roy F:
Diverse functions of p120ctn in tumors
Biochim Biophys Acta 11: 1016-1027, 2006

55 van Roy FM, McCrea PD:
A Role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer?
Nat Rev Cancer 19: 2-10, 2005

56 Weinel RJ, Neumann K, Kisker O, Rosendahl A:
Expression and potential role for E-Cadherin in pancreatic carcinoma.
Int J Pancreatol 19: 25-30, 1996

57 Weis WI, Nelson WJ:
Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum.
J Biol Chem 281: 35593-35597, 2006

58 Wjinhoven BPL, Dinjens WNM, Pignatelli M:
E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer.
Brit J Surg 87: 992-1005, 2000

59 Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman K, Reynolds AB:
p120-Catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonsim between Ray and Rho.
Cell 127: 1027-1039, 2006

60 Xia X, Carnahan RH, Vaughan MH, Wildenberg GA, Reynolds AB:
p120 serine and threonine phosphorylation is controlled by multiple ligand-receptor pathways but not cadherin ligation.
Ex Cell Res 312: 3336-3348, 2006

61 Xiao K, Oas RG, Chiasson CM, Kowalczyk AP:
Role of p120-catenin in cadherin trafficking
Biochim Biophys Acta 1773: 8-16, 2006

62 Yanagisawa M, Kaverina IN, Wang A, Fujita Y, Reynolds AB, Anastasiadis PZ:
A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function.
J Biol Chem 279: 9512-9521, 2004

63 Yanagisawa M, Anastasiadis PZ:
p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness.
J Cell Biol 174: 1987-1096, 2006

64 Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM:
The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral custering, ahesive srengthening, and iteraction with $p120^{ctn}$.
J Cell Biol 141: 779-789, 1998

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Guido Adler danke ich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und des hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatzes.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Andre Menke für die unermüdliche und ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die stete Bereitschaft zum Gespräch.

Vielen Dank an Frau Dr. Yukiko Imamichi für viele gelöste Probleme und beantwortete Fragen während der experimentellen Arbeit und danach.

Frau PD Dr. Klaudia Giehl, Frau Iris Baum und Frau Claudia Längle danke ich für die kollegiale und nette Zusammenarbeit.

Vielen Dank schließlich an meine Familie die mich immer unterstützt hat und ohne die mir das Medizin-Studium nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Angaben	Melanie Wünsch geboren am 06.09.1973 in Schwäbisch Gmünd

Schulbildung

1984 - 1990	Grundschule, Adalbert-Stifter-Realschule
2000 – 2002	Wirtschaftsoberschule in Stuttgart Abiturnote: 1,1

Berufsausbildung

1990 – 1993	Ausbildung zur Bankkauffrau
1994	Weiterbildung zur Bankfachwirtin (WSA)
1996 – 1997	Weiterbildung zur Bankbetriebswirtin (WSA)

Hochschulstudium

2002 – 2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm 09/2004 Ärztliche Vorprüfung 12/2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 12/2008 Approbation als Ärztin
2005 - 2008	Erstellung der Dissertation bei Prof. Dr. Guido Adler, Zentrum für Innere Medizin I, Arbeitsgruppe PD Dr. Andre Menke

Nebentätigkeiten

2004 – 2005	Wissenschaftliche Hilfskraft im Kurs der makroskopischen Anatomie
2006	Wissenschaftiche Hilfskraft im Kurs der mikroskopischen Anatomie

Fremdsprachen	Englisch, Französisch