

**Aus dem Universitätsklinikum Münster**

**Medizinische Klinik und Poliklinik B**

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Domschke-

---

Charakterisierung des Cadherin/Catenin-Komplexes in den  
humanen Pankreas-Adenokarzinomzelllinien  
PaTu 8889T und PaTu 8889S

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

**vorgelegt von**

**Ulrike Neuhaus**

**aus Lüdinghausen**

**2004**

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

**Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens**

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. T. Kucharzik

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. M.M. Lerch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2004

---

**Aus dem Universitätsklinikum Münster****Medizinischen Klinik und Poliklinik B**

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Domschke -

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. T. Kucharzik

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. M.M. Lerch

**ZUSAMMENFASSUNG****Charakterisierung des Cadherin/Catenin-Komplexes in den humanen Pankreas-Adenokarzinomzelllinien PaTu 8889T und PaTu 8889S**

-Ulrike Neuhaus-

Die vorliegende Arbeit untersucht anhand der Schwesterzelllinien PaTu 8889S und PaTu 8889T den Einfluss des Cadherin/Catenin-Komplexes auf die Wachstumseigenschaften von Tumorzellen. Diese wurden mittels zellbiologischer Assays charakterisiert, anschließend wurde der Cadherin/Catenin-Komplex mittels proteinchemischer und immunhistochemischer Methoden analysiert. Die Zelllinie PaTu 8889T zeigte im Gegensatz zu PaTu 8889S keinerlei Ausbildung von Zell-Zellkontakten und mit der Fähigkeit zu schneller Migration und dem Verlust der Kontaktinhibition das autonomere Wachstumsverhalten. Als dafür entscheidender Faktor konnte ein Fehlen von E-Cadherin in PaTu 8889T gezeigt werden. Weitere Analysen zeigten die Auswirkungen des Verlustes von E-Cadherin auf die intrazellulär gelegenen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und p120-Catenin. Die retroviral induzierte Expression von E-Cadherin in PaTu 8889T führte in der entstehenden Tumorzelllinie zur Formation von Zell-Zellkontakten, einer Verhinderung von schneller Migration und der Induktion von Kontaktinhibition. Die Formation von stabilen Zell-Zellkontakten konnte mit der Bindung sowohl einer kurzen p120<sup>ctn</sup>-Isoform 3 als auch einer langen Isoform 1 an E-Cadherin in Verbindung gebracht werden. Die Reduktion der endogenen Menge einer langen p120<sup>ctn</sup>-Isoform in E-Cadherin exprimierenden PaTu 8889T-Zellen führte außerdem zu einer veränderten Zellmorphologie und zur Verhinderung schneller Zellmigration. Das so etablierte Zellmodell stellt ein sinnvolles System zur Analyse der Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes dar und trägt zur Klärung der grundlegenden Mechanismen von Tumorentstehung und Tumorwachstum bei.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2004

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	10
<b>1.1 Das Pankreaskarzinom</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Mechanismen der Tumorentstehung und Tumorcharakteristika</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Die Cadherin/Catenin-Familie</b>	<b>14</b>
1.3.1 Aufbau des Cadherin/Catenin-Komplexes	14
1.3.2 Regulation der Zelladhäsion am Cadherin/Catenin-Komplex	19
1.3.3 Rolle des Cadherin/Catenin-Komplexes bei der Entstehung malignen Wachstums	22
<b>1.4 PaTu 8889S und PaTu 8889T-Zelllinien als Tumormodell</b>	<b>23</b>
<b>1.5 Aufgabenstellung</b>	<b>25</b>
2. MATERIAL UND METHODEN	26
<b>2.1 Bezugsquellennachweis</b>	<b>26</b>
2.1.1 Chemikalien/Materialien	26
2.1.2 Enzyme und Kits	28
2.1.3 Puffer	28
2.1.4 Zellkulturmedien und Antibiotika	29
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	30
2.1.6 Materialien für die Zellkultur	30
2.1.7 Geräte und Software	30
2.1.8 Antikörper	32
2.1.9 Zelllinien	32
2.1.10 Vektoren und Konstrukte	32
<b>2.2 Zellkulturtechniken</b>	<b>33</b>

2.2.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	33
2.2.2	Mykoplasmentest	33
2.2.3	Herstellung rekombinanter Retroviren in 293-Zellen	33
2.2.4	Retroviraler Gentransfer in PaTu 8889T-Zellen	34
2.2.5	Selektion und Klonierung der infizierten PaTu 8889T-Zellen	34
<b>2.3</b>	<b>Proteinanalytische Methoden</b>	<b>35</b>
2.3.1	Herstellung von Zelllysaten aus adhärenen Zellen	35
2.3.2	Protein-Konzentrationsbestimmung	35
2.3.3	Immunpräzipitation von Proteinen	36
2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.3.5	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)	37
2.3.6	Immunoblot	37
2.3.7	Detektion mit dem ECL-Verfahren	38
<b>2.4</b>	<b>Immunhistochemische Detektion</b>	<b>39</b>
2.4.1	Kultivierung und Fixierung von Zellen auf 4-well-chamber-slites	39
2.4.2	Einzel-Immunomarkierung	39
2.4.3	Doppel-Immunomarkierung	39
2.4.4	Mikroskopie und Bildbearbeitung	40
<b>2.5</b>	<b>Biologische Zellkulturassays</b>	<b>40</b>
2.5.1	Untersuchung des Wachstums von Zellen im MTT-Wachstumsassay	40
2.5.2	Untersuchung der Koloniebildung von Zellen im Limited-Dilution-Assay	41
2.5.3	Untersuchung der Koloniebildung von Zellen im Soft-Agar-Assay	41
2.5.4	Untersuchung der Zellen im In-Vitro-Wounding-Assay	42
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Zelllinien im zellbiologischen Assay</b>	<b>43</b>
3.1.1	Untersuchung der Wachstumseigenschaften im MTT-Wachstumsassay	44
3.1.2	Untersuchung der Koloniebildung im Limited-Dilution-Assay	45
3.1.3	Untersuchung der Koloniebildung im Soft-Agar-Assay	46

3.1.4	Untersuchung der Migrationseigenschaften im In-Vitro-Wounding-Assay	47
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung des Cadherin/Catenin-Komplexes in den Zelllinien PaTu 8889S und PaTu 8889T</b>	<b>49</b>
3.2.1	Analyse der Zusammensetzung des Cadherin/Catenin-Komplexes in PaTu 8889S und PaTu 8889T im Western Blot	49
3.2.2	Analyse der Lokalisation der Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes in PaTu 8889S und PaTu 8889T in Immunfluoreszenz-Experimenten	50
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen in den Zelllinien PaTu 8889S und PaTu 8889T</b>	<b>53</b>
3.3.1	Analyse der p120 <sup>ctn</sup> -Isoformen in PaTu 8889S und PaTu 8889T	53
3.3.2	Assoziation der p120 <sup>ctn</sup> -Isoformen zum Cadherin/Catenin-Komplex	55
<b>3.4</b>	<b>Funktion von E-Cadherin in Struktur und zellbiologischem Verhalten von Tumorzellen</b>	<b>59</b>
3.4.1	Charakterisierung des Cadherin/Catenin-Komplexes in der E-Cadherin-infizierten PaTu 8889T-Zelllinie	59
3.4.2	Einfluss der Expression von E-Cadherin auf das zellbiologische Verhalten von PaTu 8889T	63
3.4.2.1	Funktion von E-Cadherin bei der Proliferation von Tumorzelllinien	63
3.4.2.2	Funktion von E-Cadherin bei der Koloniebildung von Tumorzelllinien	65
3.4.2.3	Funktion von E-Cadherin bei der Migration von Tumorzelllinien	66
4.	DISKUSSION	68
<b>4.1</b>	<b>Die Rolle von E-Cadherin bei der Proliferation und Migration von humanen Pankreas-Adenokarzinomzelllinien</b>	<b>68</b>
4.1.1	E-Cadherin führt durch die Formation von Zell-Zellkontakten zu einer Reduktion autonomen Wachstums in PaTu 8889T	68
4.1.2	E-Cadherin inhibiert Signaltransduktionswege durch die Bindung von Cateninen	69
4.1.3	Der Verlust von E-Cadherin begünstigt die Tumorentstehung	70

<b>4.2</b>	<b>Die Rolle von p120<sup>ctn</sup> bei der Proliferation und Migration von humanen Pankreas-Adenokarzinomzelllinien</b>	<b>72</b>
4.2.1	Die große Variationsbreite der p120 <sup>ctn</sup> -Isoformen in PaTu 8889S bietet vielfältige Regulationsmöglichkeiten	72
4.2.2	Die p120 <sup>ctn</sup> -Isoform 3 stabilisiert in den PaTu-Zelllinien E-Cadherin an Zell-Zellkontakten	73
4.2.3	Eine lange p120 <sup>ctn</sup> -Isoform beeinflusst die Migrationseigenschaften der PaTu-Zelllinien	74
4.2.4	Funktion der unterschiedlichen p120 <sup>ctn</sup> -Isoformen bei der Stimulation autonomen Zellwachstums	76
4.3	PaTu 8889S und PaTu 8889T als Tumormodell	78
5.	ZUSAMMENFASSUNG	79
6.	LITERATURVERZEICHNIS	81
7.	DANKSAGUNG	91
8.	LEBENS LAUF	92



# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

Neben den Zystadenomen und hormonaktiven Tumoren, die meist im Rahmen multipler endokriner Neoplasien (MEN) auftreten, machen die Adenokarzinome den größten Anteil der Pankreastumoren aus. Außer den seltener auftretenden Plattenepithel-, Zystadeno- oder Azinuszellkarzinomen findet man in 75-80 % der Fälle ein vom Gangepithel der Pankreasdrüsenformationen ausgehendes duktales Adenokarzinom. Seine Inzidenz beträgt in den Industrienationen ca. 10/100000 pro Jahr und manifestiert sich, häufiger bei Männern, meist in der 4.-6. Lebensdekade. Zur Zeit zeigen sich Mortalitätsraten bei Männern von 8-12, bei Frauen von 4-6/100000.<sup>45</sup> Als Risikofaktoren werden höheres Lebensalter, männliches Geschlecht, Nikotinabusus, Nitrosamine, fettreiche Ernährung, chronische Pankreatitiden und Diabetes mellitus mit der Pathogenese des Tumors in Verbindung gebracht.<sup>4,35</sup> Molekularpathologische Untersuchungen haben außerdem Veränderungen des K-ras- und p53-Gens gezeigt.<sup>22,68</sup>

Das meist im Pankreaskopfbereich lokalisierte und damit häufig die ableitenden Pankreas- und Gallenwege verlegende Karzinom hat makroskopisch ein helle, derbe Struktur. Die Schnittfläche weist Ulzerationen und zentrale Nekrosen begleitet von perifokalen Bindegewebsneubildungen auf. Die Tumorränder sind unscharf und werden in den Vernarbungsprozess der begleitenden chronisch obstruktiven Pankreatitis einbezogen. Das histologische Erscheinungsbild zeigt abhängig vom Differenzierungsgrad unterschiedliche Befunde. Während hoch differenzierte Tumoren dichtgelagerte Drüsenschläuche mit polarer Anordnung des Zylinderepithels und gleichmäßiger Schleimproduktion aufweisen, zeigen weniger differenzierte Karzinome ein Nebeneinander von hochdifferenzierten Drüsenformationen und wenig ausgereiften tubulären Strukturen.<sup>41</sup> Charakteristisch sind die intensive Stromareaktion und in 90 % der Fälle eine Invasion der Nervenscheiden.<sup>10</sup>

Klinisch manifestiert sich das Adenokarzinom meist erst in symptomatischen und somit schon fortgeschrittenen Stadien, in denen die Organgrenzen meist schon überschritten sind. Neben unspezifischen Tumorsymptomen (B-Symptomatik) werden oft ein schmerzloser Ikterus oder unspezifische Oberbauchschmerzen angegeben.

Verdauungsstörungen werden durch die Begleitpankreatitis und die Verlegung der Gallenwege verursacht. Des Weiteren zeigen sich Gewichtsverlust und Schmerzen durch Infiltration der Nervenplexus.<sup>10</sup> Pankreasinsuffizienz mit Maldigestion und Diabetes mellitus sind Spätsymptome. Gelegentlich werden die Pankreaskarzinome im Rahmen paraneoplastischer Syndrome von Venenthrombosen der unteren Körperhälfte begleitet.

30 % der als T1-gestageten Tumoren zeichnen sich bereits durch eine Mikrometastasierung aus, noch bevor sich erste klinische Symptome zeigen oder technisch Befunde erhoben werden können. Vor allem aufgrund früher lymphogener Metastasierung in regionäre Lymphknoten und später hämatogener Aussaat vorwiegend in Leber und Lungen, hat das Pankreaskarzinom bereits bei Diagnosestellung meist eine sehr schlechte Prognose. Die mittlere Überlebenszeit liegt bei 6 Monaten.<sup>54</sup> Das als topographische Sonderform des duktales Pankreaskarzinoms an der Ampulla Vateri lokalisierte Papillenkarzinom zeigt wegen seiner früheren klinischen Manifestation durch den Verschluss von ductus pancreaticus major und minor eine bessere Prognose.<sup>7</sup>

In der Diagnostik des Pankreaskarzinoms kommen neben Laboruntersuchungen (Tumormarker CEA, CA 19-9) und nichtinvasiven Methoden wie Sonographie, MRT und CT vor allem invasive Maßnahmen wie Endoskopie mit Biopsie, ERCP, Angiographie und Feinnadelbiopsie zum Einsatz.<sup>1,6</sup> Während eine radikale Operation beim prognostisch günstigen Papillenkarzinom anzustreben ist, ist diese beim Pankreaskopfkarzinom nur bei begrenztem Lokalbefund und fehlender Metastasierung sinnvoll. Bei inoperablem Befund kommen palliative Eingriffe vor allem zur Galleableitung und zur Wiederherstellung der Magen-Darm-Passage in Frage.<sup>24,62</sup>

## **1.2 Mechanismen der Tumorentstehung und Tumorcharakteristika**

Jede umschriebene Gewebsvermehrung kann als Tumor bezeichnet werden. Diese Begriffsdefinition schließt Ödeme und Gewebsschwellungen z.B. im Rahmen von Entzündungen mit ein. Im medizinischen Sprachgebrauch allerdings meint der Begriff Tumor, synonym mit dem der Neoplasie, autonome Zellteilung, die von den Regulations- und Regenerationsmechanismen des Organismus entkoppelt ist. Die Entstehung autonomen Wachstums ist als Prozess zu verstehen, in dem das betroffene

Gewebe durch Prädisposition, spezifische Noxen und durch gegenwärtige Bedingungen (zum Beispiel Immundefizienz, Infektion mit onkogenen Viren, Kontakt zu Tumorpromotoren usw.) geschädigt wird. Die Summation dieser Faktoren begünstigt die Tumorentstehung.<sup>31</sup> Bestimmte Faktoren gelten als prädisponierend für die Entartung von Zellen, wie zum Beispiel familiäre Risikofaktoren, deren Bedeutung allerdings für verschiedene Tumoren unterschiedlich ist. Dominant vererbte Veranlagungen sind zum Beispiel für das Mamma-Karzinom, das Bronchial-Karzinom oder auch für ganze Tumorfamilien, wie z.B. multiple endokrine Neoplasien, bekannt. Die der Vererbung von Tumoren genetisch zugrundeliegenden Veränderungen betreffen Mutationen in Genen, die z.B. das Zellwachstum, Signaltransduktionswege, Transkriptionsfaktoren, DNA-Reparatur, Apoptosevorgänge und vieles mehr beeinflussen. Als primär kanzerogene Stoffe gelten ebenfalls vielfältige chemische und physikalische Noxen sowie Strahleneinwirkung, die auf verschiedenste Weise vermutlich zu einer Schädigung der DNA der betroffenen Zelle führen. Betrifft die Schädigung Gene, die am Zellzyklus direkt oder regulatorisch beteiligt sind (Onkogene), oder solche, die die Inhibition von Wachstumsvorgängen kodieren (Suppressorgene), so wird die Zelle onkogen potent. Nach einer unter Umständen sehr lange dauernden Latenzzeit können Promotoren dosisabhängig und oft reversibel eine Steigerung der Zellproliferation einleiten. Kokarzinogene wie z.B. Hormone, Infektionen mit bestimmten Viren oder der Kontakt zu gewissen Chemikalien begünstigen die Entartung. Im Stadium der Progression kommt es zur Proliferation veränderter Zellklone, die nun erstmals auch makroskopisch als Knoten in Erscheinung treten.<sup>50</sup> Am Ende der nun irreversiblen Veränderungen steht meist die Metastasierung. Die Metastasenbildung gilt als Malignitätskriterium und setzt die Fähigkeit entarteter Zellen voraus, sich aus der Tumormasse zu lösen. Umgebende Strukturen werden aufgelöst, um in die Lymph- oder Blutbahn zu gelangen. In der terminalen Endstrombahn haftet die Zelle abhängig vom Rezeptorbesatz an und invadiert das betroffene Gewebe. Mit Hilfe von angiogenen Faktoren ist die Zelle in der Lage, neue Tumoren an der entsprechenden Stelle zu bilden.<sup>15,29,44</sup>

Die Dignität eines Tumors wird abhängig von seinem Verhalten in benigne und maligne gegliedert. Nicht eindeutig zuzuordnende Formen werden als semimaligne oder intermediär bezeichnet. Das Hauptmerkmal bei der Einordnung ist neben der

Wachstumsform vor allem die Metastasierungsfähigkeit sowie der Differenzierungsgrad der vorherrschenden Zellen. Wenig differenzierte Tumorzellen zeigen dabei weniger Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe und sind daher als höher maligne einzuschätzen als solche, die dem Differenzierungsgrad des Primarius entsprechen.

Während benigne Tumoren vorwiegend langsames und verdrängendes Wachstum zeigen, sich gut vom umgebenden Gewebe abgrenzen, meist differenzierte Zellen mit großer Ähnlichkeit zum Primärgewebe mit wenig Zellveränderungen aufweisen und nicht metastasieren, wachsen maligne Tumoren schnell und invasiv und sind daher nur schwer vom umgebenden Gewebe abzugrenzen. Sie zeigen meist unreife, heterologe Gewebe mit zahlreichen Zelltypen. Die Krankheitsverläufe sind häufig kurz, Metastasierung und Rezidive zahlreich. Nicht jeder Tumor ist dabei primär als maligne einzuschätzen, eine spätere Transformation eines primär benignen Tumors in ein Malignom im Sinne einer Adenom-Karzinom-Sequenz ist möglich.<sup>5,70</sup>

Um das Tumorstadium sowie den Behandlungserfolg international zu standardisieren, werden Tumoren anhand der TNM-Klassifikation beurteilt, die die wichtigsten Tumorcharakteristika zusammenfasst: Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T), Tumorbefall der regionalen Lymphknoten (N), Nachweis von Tumormetastasen (M). Diese Klassifizierung wird durch das sogenannte Grading ergänzt, das Aussagen über die Prognose des Tumors erlaubt. Dabei liegt die Beobachtung zugrunde, dass Wachstumsgeschwindigkeit, Malignität und Strahlenempfindlichkeit des Tumors mit dem Grad der Entdifferenzierung zunehmen. Daher werden die Tumoren ihrem Differenzierungsgrad entsprechend in Grad G1 (hochdifferenziert, geringe Malignität) bis Grad G4 (undifferenzierter, anaplastischer Tumor) eingeteilt.<sup>32</sup>

Zusammenfassend wird deutlich, dass Tumorentstehung und Tumorstadium multifaktorielle Prozesse darstellen, die in verschiedensten Erscheinungsformen gipfeln und bis jetzt nur wenig verstanden sind. Die Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen der Tumorigenese und erscheint unabdingbar für die frühe Tumordiagnostik und die damit verbundene Therapie sowie für die Tumorprävention. Einige Mechanismen der Tumorentstehung zeigen außerdem Ähnlichkeiten mit Pathomechanismen der Entzündung und zeigen damit zusätzlich die Bedeutung ihrer Analyse.

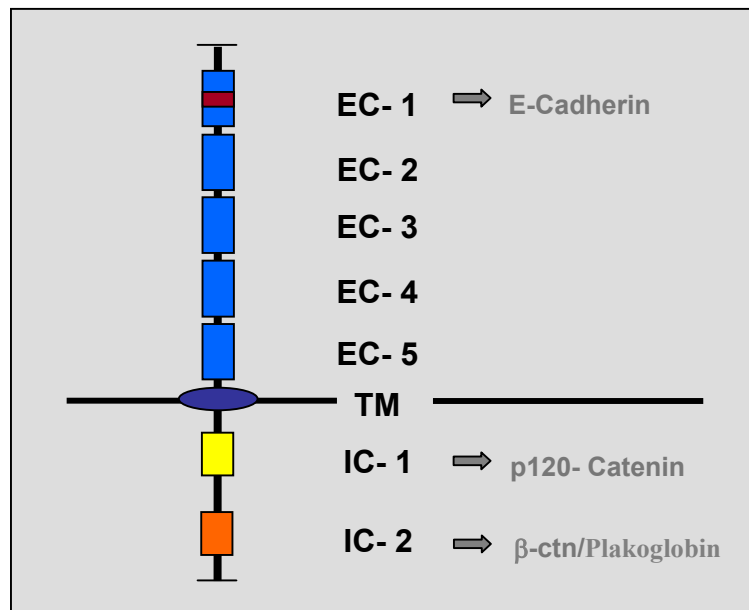
### 1.3 Die Cadherin/Catenin-Familie

Zell-Zellkontakte werden in epithelialen Zellverbänden durch verschiedene Proteinkomplexe gebildet. Diese Komplexe bestehen aus einer Ansammlung von spezifischen transmembranären Zelladhäsionsrezeptoren, die sowohl mit dem Zytoskelett verbunden sind und damit eine Rolle in der Zellstabilität spielen, als auch Bestandteile intrazellulär vermittelter Signaltransduktionskaskaden darstellen. Ihre Funktion liegt während der Embryonalentwicklung in der Organisation und Differenzierung von spezifischen Gewebetypen. Im adulten Organismus sind sie für die Aufrechterhaltung der Integrität, Polarität und Zellarchitektur verantwortlich. Störungen in diesem System finden in fehlerhaften Anlagen von Geweben oder aber auch in Entdifferenzierungsvorgängen, zum Beispiel in der Entstehung malignen Wachstums oder in Metastasierungsvorgängen, ihren Ausdruck. Des Weiteren spielt der Zusammenbruch suffizienter Zell-Zellkontakte auch bei Entzündungsvorgängen in Gestalt von Ödemen und Infiltraten eine Rolle.

Die unterschiedlichen Klassen von Zell-Zellkontakten verwenden zwei strukturell charakteristische Typen von transmembranären Adhäsionsmolekülen. Die erste Gruppe von Adhäsionsmolekülen besteht aus Proteinen mit vier Membrandurchgängen, deren Amino- und Carboxyterminus intrazellulär liegen. Zu dieser sehr heterogenen Gruppe zählen die Connexine, die Gap Junctions ausbilden, ebenso wie die Proteine Occludin und Claudin, die den membranständigen Teil der Tight Junctions bilden. Die zweite wichtige Gruppe wird von den Cadherinen gebildet. Zur Vereinfachung wurde die Superfamilie der Cadherine in zwei Gruppen unterteilt: die klassischen Cadherine (Typ I-Cadherine), die Zell-Zellkontakte an Adherens Junctions ausbilden, und die desmosomalen Cadherine, die lediglich in desmosomalen und hemidesmosomalen Verbindungen zu finden sind.<sup>27,72,76,84</sup>

#### 1.3.1 Aufbau des Cadherin/Catenin-Komplexes

Die Typ I Cadherine, zu denen auch E-Cadherin zählt, bilden eine aus mehr als 30 Proteinen zusammengesetzte Gruppe, denen eine hochkonservierte carboxyterminale intrazelluläre Domäne gemein ist.



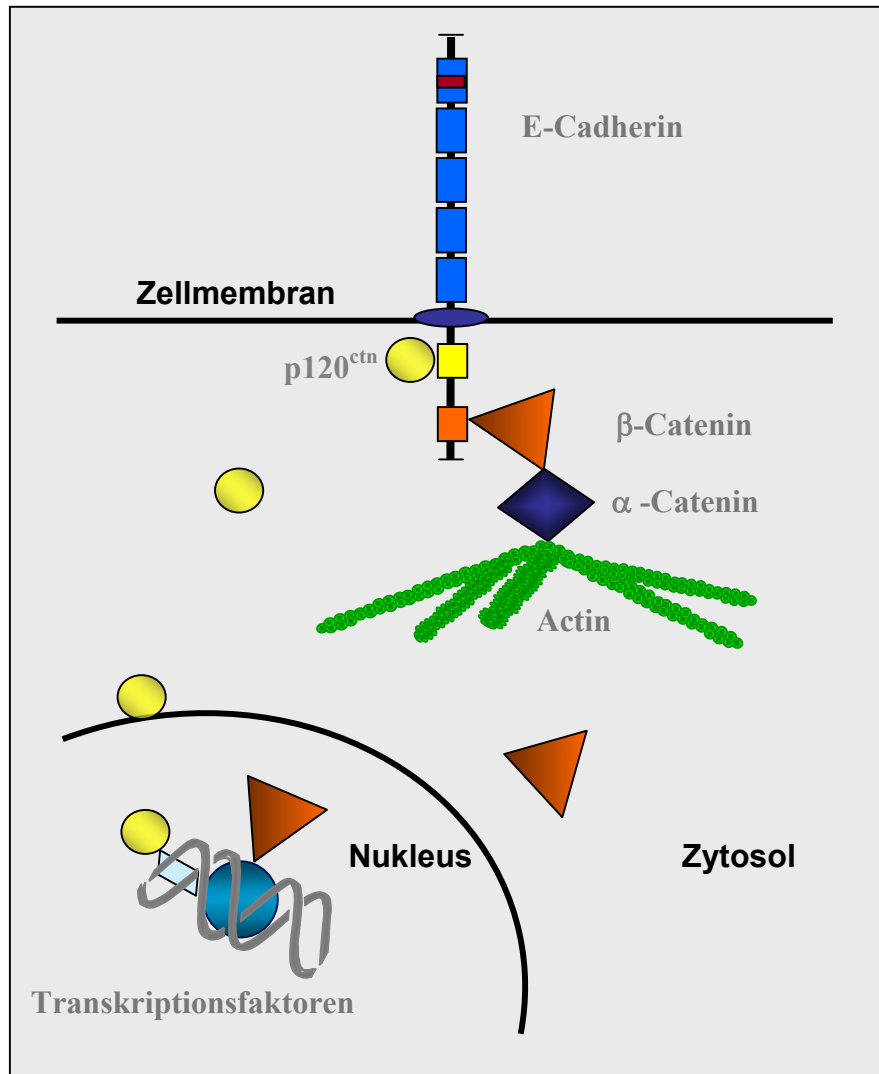
**Abb. 1 Struktur von E-Cadherin und seiner Bindungsregionen**

Die extrazelluläre Domäne umfasst fünf Wiederholungssequenzen (EC1-EC5), deren am weitesten zum N-Terminus gelegene Sequenz (EC-1) weitere E-Cadherine bindet. Die intrazytoplasmatische Domäne (IC1, IC2) vermittelt den Kontakt zu den Cateninen.

Der C-Terminus (IC-2) assoziiert mit  $\beta$ -Catenin oder Plakoglobin, während die juxta-membranäre Domäne (IC-1) E-Cadherin mit p120<sup>ctn</sup> verbindet.  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin binden über ihren N-Terminus an  $\alpha$ -Catenin, das den Kontakt zum Zytoskelett herstellt.

Die klassischen Cadherine (Abb.1) bestehen dabei aus einer extrazellulären Domäne, die den Kontakt zu den Nachbarzellen herstellt, einem transmembranären Segment und einer zytoplasmatischen Domäne, die die intrazellulären Bestandteile des Komplexes bindet. Die extrazelluläre Domäne ihrerseits ist aus fünf jeweils 110 Aminosäuren umfassenden Wiederholungssequenzen (EC1-EC5) zusammengesetzt, deren am weitesten zum N-Terminus gelegene Sequenz die Bindungsdomäne darstellt. Hiermit sind benachbarte Zellen in der Lage, calciumabhängig reißverschußartige Dimere zu bilden.<sup>56,71</sup> Die hochkonservierte intrazytoplasmatische Domäne (IC1, IC2) vermittelt den Kontakt zu den Cateninen, die ihrerseits die Brücke zum Aktin-Zytoskelett darstellen. Der Carboxy-Terminus des E-Cadherin-Moleküls assoziiert mit  $\beta$ -Catenin oder Plakoglobin, während die juxta-membranäre Domäne E-Cadherin zum Beispiel mit dem ursprünglich als src-Kinase-Substrat identifizierten Protein p120<sup>ctn</sup> oder anderen Proteinen der Armadillo-Familie wie ARVCF oder Präsenilin-1 verbindet.<sup>60</sup>  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin binden über ihren N-Terminus direkt an das Vinculin-

verwandte  $\alpha$ -Catenin, das den Kontakt zu Aktin als strukturgebenden Bestandteil des Zytoskeletts herstellt.<sup>81</sup>



**Abb. 2 Schematische Struktur des Cadherin-Catenin-Komplexes**

E-Cadherin assoziiert mit entweder  $\beta$ -Catenin oder Plakoglobin, während die juxta-membranäre Domäne E-Cadherin mit p120<sup>ctn</sup> verbindet.  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin binden über ihren N-Terminus direkt an das Vinculin-verwandte  $\alpha$ -Catenin, das den Kontakt zu Actin herstellt. Sowohl für  $\beta$ -Catenin als auch für p120<sup>ctn</sup> sind Translokationen in das Zytosol und in den Zellkern bekannt. Durch ihre Bindung an Transkriptionsfaktoren nehmen sie an der Regulation des Zellzyklus teil.

$\alpha$ -Catenin stellt das den Cadherin/Catenin-Komplex mit dem Zytoskelett verbindende Element dar. Viele Experimente haben in der Vergangenheit die Vermutung gestützt, dass die Ausbildung suffizienter Zell-Zellkontakte an Cadherinen ohne  $\alpha$ -Catenin nicht in ausreichendem Maße möglich ist.<sup>14</sup> Seine Rolle für die Stabilität des

Cadherin/Catenin-Komplexes wird in den multiplen möglichen Bindungspartnern von  $\alpha$ -Catenin deutlich: Studien zeigten eine direkte Interaktion mit  $\beta$ -Catenin, Plakoglobin, Vinculin<sup>81</sup> sowie  $\alpha$ -Actinin<sup>42</sup>, des Weiteren werden auch Spectrin und Actin selbst als mögliche Bindungspartner vermutet.<sup>66</sup> Auf welche Weise allerdings  $\alpha$ -Catenin an diese Moleküle bindet, und welche Rolle diese Bindungen spielen, ist vielfach ungeklärt.

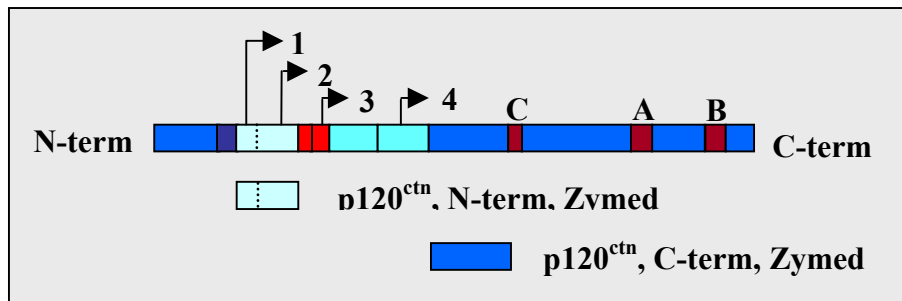
$\beta$ -Catenin stellt mit seiner zentralen Armadillo-repeat-Region das strukturbildende Molekül des zytoplasmatischen Catenin-Komplexes dar.<sup>9</sup> Es ist der kritische Bestandteil für die Bindungsstärke des Cadherin/Catenin-Komplexes.<sup>36</sup> Mehr in den Blickpunkt gerückt ist es allerdings als Bestandteil des wnt-Signaltransduktionsweges. Experimente an *Drosophila* konnten zeigen, dass es durch das wnt-Signal zu einer Stabilisierung des zytoplasmatischen Pools an  $\beta$ -Catenin kommt, und  $\beta$ -Catenin somit eine Translokation in den Zellkern und die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der LEF (leucocyte enhance factor)/TCF (T-cell factor)-Familie ermöglicht werden.<sup>18</sup> Des Weiteren wurde deutlich, dass  $\beta$ -Catenin auch unabhängig von LEF oder TCF in der Lage ist, in den Zellkern zu gelangen. In Import-Assays zeigte  $\beta$ -Catenin ein ähnliches Verhalten wie der nukleäre Transportfaktor Importin- $\beta$ , ein weiteres arm-repeat-Protein.<sup>57</sup>

Das Armadillo-repeat Protein p120<sup>ctn</sup> wurde zum ersten Mal von Reynolds et al. 1989 als Substrat des Src-Onkoproteins identifiziert.<sup>65</sup> Sein Armadillo-Motiv, das eine 22 %ige Homologie zu  $\beta$ -Catenin aufweist, führte zu weiteren Experimenten, die eine Interaktion zwischen p120<sup>ctn</sup> und der Familie der Cadherine zeigen konnten. Eine direkte Bindung an  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Catenin konnte für p120<sup>ctn</sup> allerdings nicht gezeigt werden.<sup>19</sup> Als Armadillo-repeat-Protein zeigte p120<sup>ctn</sup> außerdem eine Bindung an KAISO, ein Mitglied der Gruppe der POZ-ZF-Transkriptionsfaktoren.<sup>19,46</sup> Aufgrund der spezifischen nukleären Lokalisation von KAISO erlangte p120<sup>ctn</sup> eine zunehmende Bedeutung als potentieller Signalübermittler in den Zellkern. Bei der weiteren Untersuchung der Struktur und Lokalisation von p120<sup>ctn</sup> wurde deutlich, dass sowohl epitheliale als auch mesenchymale Zellen p120<sup>ctn</sup> exprimieren. Dabei zeigten sich jedoch in verschiedenen Geweben unterschiedliche Varianten von p120<sup>ctn</sup>. Die Expression dieser p120<sup>ctn</sup>-Isoformen zeigte im Western Blot ein spezies- und zelltypspezifisches Bandenmuster. Die Isoformen stellen alternative Splicevarianten ein- und desselben Gens dar.<sup>40</sup> Durch Splicing sowohl am N- als auch am C-Terminus





Zur Detektion der verschiedenen Isoformen verwendeten wir in unseren Experimenten die in Abb.4 schematisch dargestellten Antikörper.



**Abb. 4 Bindungsregionen und Detektion der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen durch die verwendeten Antikörper**  
 Der zur Detektion verwendete N-Terminal ansetzende Antikörper der Firma Zymed greift am ersten Startcodon des Gens an und identifiziert somit die p120<sup>ctn</sup>-Isoformen 1 und 2. Das Epitop des C-Terminal ansetzenden Antikörpers liegt weiter distal in einer allen Isoformen gemeinsamen Region.

### 1.3.2 Regulation der Zelladhäsion am Cadherin/Catenin-Komplex

Cadherine assoziieren mit den Mitgliedern der Catenin-Familie an Zell-Zellkontakten. Die Catenine wiederum verankern die transmembranären Proteine mit dem Zytoskelett. Während die Auflösung von Zell-Zellkontakten einen physiologisch wichtigen Prozess in der Ontogenese, bei Zellwachstum, Proliferation, Wundheilung oder Reparaturvorgängen darstellt, ist der Verlust von Zell-Zellkontakten gleichzeitig Pathomechanismus bei der Entstehung pathologischer Zustände in eukaryotischen Organismen. Dazu zählen die zelluläre Antwort des Organismus im Rahmen von Intoxikationen und Entzündungen und vor allem die Entwicklung maligner Geschwülste mit nachfolgender Metastasierung. Cadherine und Catenine spielen also eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellstabilität und der Integrität von Geweben. Für einige Catenine wie p120<sup>ctn</sup> und  $\beta$ -Catenin konnte eine Umverteilung in Zytosol und Zellkern und eine Beteiligung an intrazellulären Signaltransduktionsvorgängen gezeigt werden.<sup>18,64</sup> Somit haben sie Auswirkungen auf Wachstums- und Differenzierungsvorgänge, Fehlfunktionen führen zu Veränderungen im Zellzyklus. Diese zentralen Vorgänge im Zellstoffwechsel bedürfen vielfältiger Regulation. Als mögliche Regulationsmechanismen kommen Veränderungen der Zusammensetzung und Expression der Bestandteile zueinander, Wechsel der Assoziationspartner, oder

posttranslationale Modifikation der Komponenten durch Glykosylierung oder Phosphorylierung in Betracht. Daneben verändern Mutationen oder Defekte die Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes.

Die kurze Halbwertszeit von E-Cadherin mit 5-10 Stunden<sup>49,74</sup> legt eine rasche Neubildung der Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes und eine Regulation durch Veränderung der Genexpression nahe. Tatsächlich scheint die Veränderung des Expressionslevels von E-Cadherin den limitierenden Faktor für die Neubildung sowie für die Stärke der Zell-Zellkontakte an Adherens Junctions darzustellen.<sup>55,83</sup> E-Cadherin selbst bietet aufgrund seiner multiplen Bindungsregionen außerdem Ansatzpunkt für vielfältige Regulationsmechanismen. Auch  $\beta$ -Catenin wird aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit vor allem durch seine Komplexbildung mit E-Cadherin reguliert, die Bindung an die Zellmembran reduziert den zytoplasmatischen Pool freien  $\beta$ -Catenins. Desweiteren unterliegt  $\beta$ -Catenin zahlreichen posttranslationalen Regulationsmechanismen: Die Assoziation von  $\beta$ -Catenin mit dem Tumorsuppressorgen APC führt zu einer Downregulation zytosolischen  $\beta$ -Catenins<sup>43</sup>, dagegen führt das bereits beschriebene wnt-Signal zu einer Stabilisierung.<sup>11,33</sup> Auch wechselnde Bindungspartner der Catenine spielen bei der Regulation der Zelladhäsion eine Rolle. Die vielfältigen Bindungspartner von  $\alpha$ -Catenin legen eine Modulation auf dieser Ebene nahe, auch wenn die Rolle der einzelnen Interaktionspartner bis jetzt weitgehend unklar geblieben ist.

Der Einfluss von p120<sup>ctn</sup> auf die Funktion des Cadherin/Catenin-Komplexes wurde lange kontrovers diskutiert. Experimente von YAP et al. konnten 1998 zeigen, dass die Expression eines C-Cadherin-Konstruktes, dem die Bindungsstelle der Catenine fehlte, jedoch nicht die juxtamembranäre Region, an der sich die Bindungsstelle für p120<sup>ctn</sup> befindet, in CHO-Zellen ein „Clustering“ von Cadherinen hervorzurufen vermochte, während ein Konstrukt mit fehlender juxtamembranärer Domäne diese Eigenschaft vermissen ließ.<sup>83</sup> Ergebnisse von Thoreson belegten ebenfalls, dass p120<sup>ctn</sup>-entkoppeltes E-Cadherin im Vergleich zum Wildtyp keine starke Adhäsion induzieren kann.<sup>78</sup> Somit wurde p120<sup>ctn</sup> mit einer Aktivierung von Cadherin-Bindungen an Zell-Zellkontakten in Verbindung gebracht. Demgegenüber standen Ergebnisse anderer Gruppen, die in Colo205 Tumorzelllinien eine Inhibition der Bindungsstärke an Zell-Zellkontakten

durch hyperphosphoryliertes p120<sup>ctn</sup> beobachteten.<sup>3</sup> Diese widersprüchlichen Effekte von p120<sup>ctn</sup> legen nahe, dass p120<sup>ctn</sup> in unterschiedlichen Organismen unterschiedliche Aktivität zeigt. Arbeiten mit verschiedenen E-Cadherin- und p120<sup>ctn</sup>-Mutanten konnten zeigen, dass E-Cadherin durch die Bindung mit p120<sup>ctn</sup>-Mutanten, denen die Phosphorylierungsdomäne fehlte, aktiviert werden kann. Diese Aktivierung gelingt auch durch die Behandlung des E-Cadherin/p120<sup>ctn</sup>-Komplexes mit Staurosporin, einem Kinase-Inhibitor.<sup>58</sup> Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch Phosphorylierung der Aktivitätszustand von E-Cadherin-gebundenem p120<sup>ctn</sup> angepasst werden kann. Phosphoryliert bleibt p120<sup>ctn</sup> inaktiv, dephosphoryliert vermittelt p120<sup>ctn</sup> die Stabilisierung von E-Cadherin an Zell-Zellkontakten.

Neueste Arbeiten verschiedener Gruppen schreiben p120<sup>ctn</sup> eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Cadherin-Expression an der Zelloberfläche verschiedenster Zellen zu. Es konnte gezeigt werden, dass p120<sup>ctn</sup>-ungebundenes E-Cadherin (dies galt auch für andere Cadherine) von der Zellmembran in degradierende Lysosomen umverteilt wird. Die Bindung von p120<sup>ctn</sup> schützt E-Cadherin vor Degradation. Weiterhin koppelt p120<sup>ctn</sup> mit E-Cadherin an das Motorprotein Kinesin und aktiviert das „Recycling“ von E-Cadherin an die Zellmembran.<sup>17,20,58,61,82</sup> P120<sup>ctn</sup> steuert auf diese Weise regulierend die Ausbildung von Zell-Zellkontakten an E-Cadherin vermittelten Adherens Junctions.

Eine weitere Modifikation des Aktivitätszustandes der Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes liegt in der Aktivierung oder Inaktivierung der kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42. Im Zellkultursystem konnte von Hall et al.<sup>30</sup> gezeigt werden, dass die Überexpression von konstitutiv aktiviertem Rac zur Akkumulation von E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin und Aktin an Zell-Zellkontakten führt. Umgekehrt führte die Überexpression einer dominant negativen Mutante von Rac zum gegenteiligen Effekt.<sup>13,77</sup> Nach Cdc42-Überexpression wurde der Zerfall des Cadherin/Catenin-Komplexes beobachtet. Neben den kleinen GTPasen scheint auch Tyrosinphosphorylierung eine wichtige Rolle in der Regulation der Cadherin/Catenin-Aktivität zu spielen: Ozawa und Kemler konnten 1998 zeigen, dass die Inhibition von Proteintyrosinphosphatasen *in vitro* zur Dissoziation von E-Cadherin und  $\alpha$ -Catenin führt.<sup>60</sup> Die Aktivierung von Tyrosinkinase in Zelllinien führte über eine Zunahme der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zur Abnahme der Bindungsstabilität der Zell-Zellkontakte.<sup>8,47,60,73</sup> Ko-Immunopräzipitations-Experimente mit membranständigen

Protein-Tyrosin-Phosphatasen zeigten deren Assoziation mit dem Cadherin/Catenin-Komplex *in vitro*<sup>12,34</sup> und legen somit deren Kontrollfunktion nahe.

### **1.3.3 Rolle des Cadherin/Catenin-Komplexes bei der Entstehung malignen Wachstums**

Die vielfältigen Funktionen der Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes spielen ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung maligner Wachstumsvorgänge. Einige Bestandteile erfüllen scheinbar Funktionen von Onkogenen oder Tumorsuppressoren. E-Cadherin kommt dabei die Rolle eines Tumorsuppressors zu. Einerseits verhindert die Expression von E-Cadherin durch die Bindung der Zellen an den Zellverband die Metastasierung von Einzelzellen, zum anderen fixiert E-Cadherin die intrazellulären Catenine an die Membran und verhindert die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden. E-Cadherin vermittelt durch diese Funktionen auch die physiologische Kontaktinhibition von Zellverbänden, der Kontakt von Zellen und die Ausbildung von Adherens Junctions führt zu einer Inhibition weiteren Zellwachstums. Der Verlust der Kontaktinhibition stellt einen frühen und entscheidenden Faktor in der Tumorigenese dar, Alterationen von E-Cadherin spielen somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Verschiedene Gruppen untersuchten unterschiedlich differenzierte Formen von Tumoren verschiedenster Gewebetypen auf die Expression von E-Cadherin. Nahezu übereinstimmend wiesen geringer differenzierte Tumorentitäten eine Downregulation oder das vollständige Fehlen von E-Cadherin auf.<sup>25,25,52,63,69</sup> E-Cadherin defiziente Tumoren zeigten außerdem starke Metastasierungstendenz: Oka et al. fanden 1993 in E-Cadherin-reduzierten Tumoren der Mamma zu 74 % Lymphknoten-Metastasen, in 86 % der untersuchten 120 Tumoren konnten bereits Fernmetastasen nachgewiesen werden.<sup>59</sup> Die reduzierte oder fehlende Expression von E-Cadherin wurde daher mit dem Übergang von benignen in maligne Tumorformen in Verbindung gebracht.

Auch die Catenine zeigten Zusammenhänge mit spezifischen Tumorformen. So fanden beispielsweise Rubinfeld et al. 1993 und Su et al. 1993 eine Assoziation des langen APC-Proteins mit sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Catenin.<sup>67,75</sup> Die Tumorsuppressoren APC und E-Cadherin binden in gleicher Weise an die Armadillo-Sequenz von  $\beta$ -Catenin und konkurrieren somit um dessen Bindungsstelle.<sup>37</sup> Die Bindung von  $\beta$ -Catenin durch APC reduziert den Pool an  $\beta$ -Catenin im Cytosol und verhindert dessen Translokation in den

Zellkern. Eine Reduktion transkriptionsfaktorinduzierter Wachstumsvorgänge ist die Folge. Defektes APC dagegen führt über den selben Mechanismus zu einer Verstärkung der Transkription der jeweiligen Zielgene. Über solche oder ähnliche Interaktionen spielen  $\beta$ -Catenin, und vermutlich in ähnlicher Weise  $\alpha$ -Catenin<sup>80</sup> oder Plakoglobin, eine Rolle bei der Entwicklung maligner Wachstumsvorgänge.

Die Rolle von p120<sup>ctn</sup> bei der Entstehung malignen Wachstums gestaltet sich vielfältig. Unterschiedliche Tumoren zeigten einen Verlust der endogenen p120<sup>ctn</sup>-Expression, in einigen Fällen konnte dieser auch mit einem aggressiveren Tumortyp in Verbindung gebracht werden.<sup>21,26</sup> Die p120<sup>ctn</sup>-defiziente Tumorzelllinie SW48 zeigte außerdem eine deutliche Reduktion von endogenem E-Cadherin und von Zell-Zellkontakten.<sup>38</sup> Der Verlust von p120<sup>ctn</sup> könnte also über die verminderte Stabilisierung von endogenem E-Cadherin einen Pathomechanismus der Tumorentstehung darstellen. Jewhari et al. beobachteten jedoch in Gewebeproben von Magenkarzinomen in ca. 66 % der Fälle eine gesteigerte p120<sup>ctn</sup>-Expression.<sup>39</sup> Untersuchungen an verschiedenen Gewebeproben von Adenokarzinomen des menschlichen Pankreas zeigten ebenfalls eine deutliche Hochregulation der p120<sup>ctn</sup>-Expression. Andere Tumorgewebe wiesen eine übermäßige Expression einzelner p120<sup>ctn</sup>-Isoformen oder eine atypische Verteilung der Isoformen in Zytosol und Zellkern auf. Aufgrund der Fähigkeiten von p120<sup>ctn</sup> als potentieller Übermittler von Wachstumssignalen in den Zellkern könnte auch in der vermehrten p120<sup>ctn</sup>-Expression ein Mechanismus der Tumorentstehung zu suchen sein.

#### **1.4 PaTu 8889S und PaTu 8889T-Zelllinien als Tumormodell**

Die Tumorzelllinien PaTu8889S und 8889T wurden 1985 von Elsässer et al. aus einer Lebermetastase eines Adenokarzinoms des Pankreas einer 64-jährigen Patientin isoliert. Die Zelllinien PaTu 8889S und PaTu 8889T wurden dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus der Probe isoliert und charakterisiert. Schnell wurden die unterschiedliche Morphologie sowie unterschiedliche Verhaltensweisen in Bezug auf Wachstumsgeschwindigkeit und Metastasierungspotential deutlich.<sup>23</sup> Elsässer et al. beschrieben lichtmikroskopisch die Morphologie der zwei Schwesterzelllinien und charakterisierten die Wachstumsgeschwindigkeit anhand von Zell-Dopplungszeiten im Amidoblack-Assay. Des Weiteren wurde der Differenzierungsgrad anhand der

Transglutaminase-Aktivität eingeschätzt. Untersuchungen zum Metastasierungspotential wurden durch Injektionsversuche sowohl subkutan als auch in die Nabelvene von Nacktmäusen vorgenommen. PaTu 8889T wies eine geringe Dopplungsrate und hohe Transglutaminase-Aktivität, invasives Wachstum subkutan, aber keine hämatogene Metastasierung bei Applikation in die Nabelvene von Nacktmäusen auf. PaTu 8889S dagegen zeigte in den beschriebenen Versuchen eine zweimal so hohe Dopplungsrate wie PaTu 8889T, eine niedrigere Transglutaminase-Aktivität sowie neben der Invasion in subkutanes Gewebe auch die Bildung von soliden Tumorabsiedlungen in der Lunge nach intravenöser Injektion. Ergänzt wurden diese Beobachtungen durch die morphologischen Kriterien in der Lichtmikroskopie. Während PaTu 8889S epitheliale Organisation zeigte und dicht gepackte Zellcluster bildete, wuchs PaTu 8889T nur in losem Kontakt zum Untergrund und zeigte keinerlei Zell-Zellkontakte. Nach subcutaner Injektion in Nacktmäuse wies PaTu 8889S solide Tumoren und eine hohe Zahl von Kernpolymorphismen auf, PaTu 8889T dagegen zeigte tubuläre Strukturen aus polygonalen Zellen mit bestimmter Polarität und prominentem Golgi-Apparat. In der Zusammenfassung aller ihrer Ergebnisse (nicht alle sind hier beschrieben) kamen Elsässer et al. zu dem Schluss, dass PaTu 8889T und PaTu 8889S zwei unterschiedliche Differenzierungsformen desselben Tumors darstellen, dabei sei PaTu 8889T die differenziertere Form.<sup>23</sup>

Die beiden Zelllinien erschienen uns geeignet, als Tumormodell zu fungieren. Unser Augenmerk richtete sich dabei besonders auf den Aufbau und die Funktion des Caherin/Catenin-Komplexes an epithelialen Adherens Junctions. Dabei sollte dessen Einfluss auf Morphologie, Wachstum und Ausbreitung von Tumoren beispielhaft untersucht werden. Vorteile der Zellkultur sind dabei die einfache Handhabung der Tumorzellen und die leichte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Natürlich kann die Charakterisierung des humanen Adenokarzinoms anhand der Tumorzelllinien in vitro nur einen Hinweis auf die tatsächlichen Mechanismen in vivo geben, erlaubt allerdings eine relativ einfache Charakterisierung und Manipulation des Systems und eine gute Ergebniskontrolle durch Zellkulturassays.

## 1.5 Aufgabenstellung

Die Zellen PaTu 8889S und PaTu 8889T stellen zwei aus demselben Primarius isolierte Zelllinien mit unterschiedlichen morphologischen und funktionellen Eigenschaften dar. Diese Unterschiede stehen vermutlich in direktem oder indirektem Zusammenhang mit Zelladhäsionsproteinen.

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst die unterschiedliche Morphologie der Schwesterzelllinien PaTu 8889S und 8889T genau mittels Lichtmikroskopie untersucht und beschrieben werden. In weiteren Versuchen sollen die Tumorzelllinien dann hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften in verschiedenen Zellkulturassays vergleichend charakterisiert werden. Außerdem analysiert unsere Arbeit den Cadherin/Catenin-Komplex in den vorliegenden Tumorzellen. Dabei werden die Expression der Bestandteile des Komplexes sowie deren Lokalisation und Zusammensetzung beobachtet. Besonders werden dabei die Expression von E-Cadherin und der Isoformen von p120<sup>ctn</sup> untersucht. Ziel ist es, die in den Zellkulturassays gewonnenen Erkenntnisse mit Unterschieden in der Struktur des Cadherin/Catenin-Komplexes der Tumorzelllinien zu verbinden.

Mit Hilfe retroviraler Infektion und Überexpression eines E-Cadherin-Konstruktes in die PaTu-Zelllinien soll dann in einem letzten Schritt die Rolle von E-Cadherin und seiner Bindungspartner weiter charakterisiert werden. Die morphologischen und funktionellen Veränderungen der Zelllinien durch die Infektion von E-Cadherin werden sowohl in den Zellkultur-Assays als auch in Western Blot und Immupräzipitationen untersucht.

Zusammenfassend soll die vorliegende Arbeit zeigen, welche Funktion die Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes, und hierbei insbesondere E-Cadherin und die p120<sup>ctn</sup>-Isoformen, in den Tumorzelllinien PaTu 8889S und PaTu 8889T haben. Die Zelllinien sollen als sinnvolles System für die Untersuchung von Mechanismen der Tumorentstehung und Tumorprogression durch Veränderungen des Cadherin/Catenin-Komplexes etabliert werden.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Bezugsquellennachweis

#### 2.1.1 Chemikalien/Materialien

β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Acrylamid	Bio-Rad, München
Adenosintri-phosphat (ATP)	Sigma, Taufkirchen
Agarose, select Agar	Gibco, Life Technologies
Agarose	Bio-Rad, München
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	AmershamPharmacia Freiburg
Bis-Acrylamid	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Amersham Pharmacia, Freiburg
BSA-c basic blocking solution	Aurion, Wageningen, Niederlande
Chloroform	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
DAPI	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Ethanol, 70 %	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Ethanol, 100 %	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Gelatine electrophoresis reagent	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl -1-piperazin-ethansulfonsre.)	Sigma, Taufkirchen
Isomamylalkohol	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamin 2000	Gibco, Life Technologies
Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Mitomycin C	Sigma, Taufkirchen
MTT	Sigma, Taufkirchen

Natriumacetat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco, Life Technologies
Paraformaldehyd, 16 %	Gibco, Life Technologies
Physiologische Kochsalzlösung	Apotheke der Uniklinik Münster
PMSF ( Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid )	Sigma, Taufkirchen
Polybrene	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Propidiumiodid	Amersham Pharmacia, Freiburg
Protein-Assay	Bio-Rad, München
Protein A Sepharose <sup>®</sup> 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Protein G Sepharose <sup>®</sup> 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Salzsäure, 1N	Sigma, Taufkirchen
Schwefelsäure, 1M	Sigma, Taufkirchen
SDS ( Natriumdodecylsulfat )	Amersham Pharmacia, Freiburg
SDS-Page Gewichtsstandard	Bio-Rad, München
TAE	Bio-Rad, München
TEMED	Bio-Rad, München
Tetra-Natrium-Pyrophosphat	Sigma, Taufkirchen
Tris-Base	Amersham Pharmacia, Freiburg
Tris-EDTA, 10 mM	Amersham Pharmacia, Freiburg
Tris-HCl	Amersham Pharmacia, Freiburg
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Triton 0,1 % in PBS	Gibco, Life Technologies
Trizol	Gibco, Life Technologies
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Vectashield	Vector Laboratories, USA

### 2.1.2 Enzyme und Kits

Enhanced Chemo Lumineszenz Kit AmershamPharmacia,  
Freiburg

### 2.1.3 Puffer

Die hier aufgeführten Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

HNTG-Puffer	50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 % Glycerin
Laemmli-Puffer (1-fach)	125 mM Tris/HCl pH 6.8, 20 % Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, 4 % SDS, 1 % $\beta$ -Mercaptoethanol
Laemmli-Puffer (4-fach)	250 mM Tris/HCl pH 6.8, 40 % Glycerin, 0.4 % Bromphenolblau, 8 % SDS, 4 % $\beta$ -Mercaptoethanol
NET (10-fach)	1.5 M NaCl, 0.05 M EDTA pH 8.0, 0.5 M Tris pH7.5, 0.5 % Triton-X-100
NET-Gelatine 0,2 %	10 % NET (10-fach) 0,2 % Gelatine ad aqua bidest.
NET-Tween	1-fach NET 0,1 % Tween 20
PBS-Tween	1-fach NET 0,1 % Tween 20
PBS	13.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 80.9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4
Tris-Glycin-SDS (10-fach)	248 mM Tris/HCl pH 8.0, 1,918 M Glycin, 1 % SDS

Transblot-SDS	48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 0,0375 % SDS, 20 % Methanol
Triton-Lysepuffer	50 mM Hepes pH 7.5 150 mM NaCl 5 mM EDTA pH 8.0 10 % Glycerin 0,1 % Triton-X-100
jeweils frisch zugeben:	10 µg/ml Aprotinin 2 mM PMSF 10 mM Natriumtetrapyrophosphat 100 mM Natriumfluorid

#### 2.1.4 Zellkulturmedien und Antibiotika

Dulbecco`s modified Eagles Medium	Sigma, Taufkirchen
Fetal Calf Serum	PAA Laboratories
Glutamin, 200 mM	Gibco, Life Technologies
G418-Sulfat-Lösung, 50 mg/ml	PAA Laboratories
Horse Serum	Gibco, Life Technologies
Modified Eagles Medium	Gibco, Life Technologies
MEM-non-essential-amino-acids	Gibco, Life Technologies
Optimem-Medium	Gibco, Life Technologies
Penicillin/Streptomycin, 100-fach	PAA Laboratories
Puromycin 100mg/ml	Gibco, Life Technologies
Trypsin-EDTA, 1-fach	Gibco, Life Technologies
DMSO	Sigma, Taufkirchen

Zusammensetzung der Medien:

Für die Zelllinien PaTu 8889S und 8889PaTu T:	88 % DMEM 5 % FCS 5 % Horse serum 1 % Glutamin 1 mg/ml Penicillin/Streptomycin zur Selektion: 2 mg/ml G418-Sulfat
---	--

Für die Zelllinie 293 :	89 % DMEM 10 % FCS 1 % Glutamin + Natrium-Pyruvat MEM-non-essential-amino-acids
-------------------------	---

Einfriermedium:	70 % DMEM 20 % FCS 10 % DMSO
Soft-Agar-Medium:	89 % MEM ( 2x ) 10 % FCS 1 % Pen/Strep

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Falcon, U.K.
Handschuhe	Kimberley-Clark
Hybond™ ECL™ Nitrozellulose-Membran	Amersham Pharmacia, Freiburg
Küvetten	Saerstedt, Nümbrecht
Polysine Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
Polytrap 296 PE	Schleicher & Schuell, Dassel
Pipettenspitzen, 10-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reagenzröhrchen, 15 ml, 50 ml	Corning
Whatman® 3mm CHR (Filterpapier)	Whatman, Großbritannien

### 2.1.6 Materialien für die Zellkultur

Cell scraper	Co-Star
Chamber slites, 4-well, 8-well	Lab-Tek
Cryotubes, 1,5 ml	Nunclon, Dänemark
Dispensertips, 5 ml, 10 ml	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipetten, steril	Eppendorf, Hamburg
Plastikpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Falcon, U.K.
Reagenzröhrchen, 15 ml, 50 ml, steril	Corning
Sterilfilter, 0,45 µm	Acrodisc
Zellkulturschalen, 6 cm, 10 cm, 15 cm, steril	Nunclon, Dänemark
Zellkulturschalen, 6 cm, steril	Falcon, U.K.
Zellkulturplatten, 96-well, 24-well, 12-well, 6-well, steril	Nunclon, Dänemark
Zellkulturflaschen, 50 ml, steril	Nunclon, Dänemark

### 2.1.7 Geräte und Software

AxioCam 12 bit Digital Mikroskop Kamera	Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland
AxioVision multi channel image processing	Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland
AxioVision single channel image processing	Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Drehschüttler	REAX 2, Heidolph
ELISA Reader	MR 5000, Dynatech, Denkendorf

Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axioskop Mikroskop, C. Zeiss Vision GmbH, Deutschland
Fluorimeter	Spectra Gemini Max, S/N G02052, Molecular Devices, Sunnyvale
Gelkammer	Criterion, Biorad, München
Gel-Dokumentationssystem	LTF, Lab.-Technik
Heizblock	Grant Instruments, Großbritannien
Inkubator	WTB Binder
Kühlschrank 4 °C	Liebherr
Kühlschrank -20 °C	AEG Nürnberg
Kühlschrank -80 °C	Forma Scientific
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Olympus OM, Kamera SC35 Typ 12, Olympus Improvision Open Lab
Mikrowelle	AEG, Nürnberg
Minishaker	IKA <sup>R</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Neubauer-Zählkammer	Eppendorf, Hamburg
PhotoImpact 3.0	Ulead Systems, Inc. Torrance, CA, USA
Photometer	LKB Biochrom, Ultrospec II, Modell4050, Cambridge, England; Cobas Bio, Programmversion 326,GFLmbH, Burgwedel, Deutschland
Pipetten 2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Power Pac 300	Bio-Rad, München
Protein-Elektrophorese Kammern	von Keutz Laborgeräte GbR, Kreuzkirchen
Schüttler	IKA <sup>R</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Slide-A-Lyzer <sup>®</sup> Dialysis Products	Pierce, Rockford IL
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Biofuge 17S, Heraeus, Hanau
Trans-Blot <sup>®</sup> SD Semi-Dry	Bio-Rad, München
Trockenschrank	Memmert GmbH + CoKG Schwabach
Schüttelmixer	MS1 Minishaker IKA <sup>R</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage	Typ Ulm Sartorius, Analytic AC 210S, Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Typ 1004S, GFL mbH, Burgwedel
Zentrifuge	Laborfuge 400, Heraeus, Hanau

### 2.1.8 Antikörper

primäre Antikörper zur Detektion in Western Blot und Immunpräzipitation:

$\alpha$ -Catenin	Mouse monoclonal antibody	Transduction Lab.
$\beta$ -Catenin	Rabbit polyclonal antibody	Sigma
$\beta$ -Catenin	Mouse monoclonal antibody	Transduction Lab.
$\beta$ -Catenin	Rabbit polyclonal antibody	Sigma
E-Cadherin, Clone36	Mouse monoclonal antibody	Transduction Lab.
$\gamma$ -Catenin	Mouse monoclonal antibody	Transduction Lab.
GP-DH	Rabbit polyclonal antibody	Trevigen
p120-Catenin, C-term	Mouse monoclonal antibody	Zymed Lab.
p120-Catenin, Clone 6H11	Mouse monoclonal antibody	Transduction Lab.
p120-Catenin, N-term	Mouse monoclonal antibody	Zymed Lab.

Sekundäre Antikörper zur Detektion in Western Blot und Immunpräzipitation:

Goat-anti-mouse	Amersham Biosciences
Goat-anti-rabbit	Amersham Biosciences
Cy-3-goat-anti-mouse	Dianova
DTAF-goat-anti-rabbit	Dianova

### 2.1.9 Zelllinien

PaTu 8889 S	humane Pankreaskarzinomzelllinie, ATCC, Elsässer et al.1992
PaTu 8889 T	humane Pankreaskarzinomzelllinie, ATCC, Elsässer et al.1992
293	Nierenfibroblasten mit Adenovirus Typ 5 DNA transformiert, ATCC

### 2.1.10 Vektoren und Konstrukte

pIXIN-Vektor	Clontec/BD Biosciences, Heidelberg
pBATEM2-E-Cadherin-Konstrukt	Max-Delbrück-Zentrum, Berlin
Die gesamte codierende Sequenz wurde mittels SAL-I in den Vektor kloniert.	
Pkat gag pol ATG	Prof. Kalthoff, Universität Kiel

## **2.2 Zellkulturtechniken**

### **2.2.1 Allgemeine Zellkulturtechniken**

Die Zellen wurden in Brutschränken bei 7% CO<sub>2</sub>, 37 °C und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig passagiert und mit frischem Medium versorgt. Alle Zellen wurden routinemäßig auf Infektion mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte in Medium aus 70 % DMEM, 20 % FCS und 10 % DMSO.

### **2.2.2 Mykoplasmentest**

Die Mykoplasmen-Kontamination von Zellkulturen beeinflusst die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führt hierdurch zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen (Rottem & Barile, 1993).

Subkonfluente Zellen wurden auf 6 cm Schalen mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15 min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0.1 mg/ml in PBS) bei 37 °C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

### **2.2.3 Herstellung rekombinanter Retroviren in 293-Zellen**

Um bestimmte Zielgene in die zu untersuchenden Tumorzellen künstlich einzufügen, benutzten wir die Methode der retroviralen Infektion. Hierbei werden zunächst Wirtszellen, hier 293-Zellen, mittels Transfektion des Zielgens und bestimmter Virusbestandteile in die Lage versetzt, infektiöse Viren, die das gewünschte Zielgen enthalten, zu produzieren und in den Überstand zu sezernieren. Die so gewonnenen hochpotenten Viren werden benutzt, um die Zielzellen, hier PaTu 8889T, zu infizieren und somit das gewünschte Gen mit hoher Effizienz zu übertragen.

Zur Produktion rekombinanter Retroviren wurden 293-Zellen mit dem Transfektionsreagenz LIPOFECTAMIN 2000 der Firma GIBCO transient transfiziert. Dazu wurden die 293-Zellen in einer Dichte von  $4 \times 10^6$  Zellen in 10-cm-Zellkulturschalen in 10 ml Medium für 24 h inkubiert. Ziel war eine Dichte von 90-95 %. 3-4 Stunden vor der geplanten Transfektion wurde das Zellkulturmedium noch einmal gewechselt.



Zur Transfektion wurden pro Platte

900 µl Optimem-Medium  
6,5 µg pKat gagpol ATG  
10 µg Zielplasmid  
3,5 µg pCMV-VSV-G

sowie

900 µl Optimem-Medium  
60 µl LIPOFECTAMIN 2000

gut gemischt. Beide Cocktails wurden gemischt und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Cocktail auf die Zellkulturplatten (mit Medium) gegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. 18 h nach der Transfektion erfolgte ein erster Mediumwechsel.

#### **2.2.4 Retroviraler Gentransfer in PaTu 8889T-Zellen**

Die Zielzellen (PaTu 8889T) wurden in der gewünschten Menge 6-well-Platten in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro well ausgesät und ca. 12 h mit normalem Zellkulturmedium mit 20 µg/ml Polybrene inkubiert. Ziel war es, die exponentielle Wachstumsphase der Zellen abzugleichen.

24h nach der Transfektion der 293-Zellen wurde der Überstand mit einer Spritze abgesaugt und durch einen 0.45 µm ACRODISC-Filter direkt auf die Zielzellen, deren Medium vorher entfernt wurde, gegeben. Die so behandelten Zielzellen wurden für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand wieder abgenommen und durch normales Zellkulturmedium ersetzt.

#### **2.2.5 Selektion und Klonierung der infizierten PaTu 8889T-Zellen**

Die mit dem Virus-Überstand infizierten PaTu 8889T-Zellen wurden nach der Transfektion für ca. drei Wochen mit 2 mg/ml G418-Sulfat selektioniert. Die so entstehenden polyklonalen Zelllinien wurden anschließend trypsiniert und in einer Dichte von 1000-2000 Zellen auf eine frische 10-cm-Zellkulturschale gebracht. Die Platten wurden für weitere 10 Tage im Inkubator belassen. Dann entstehende Einzelzellklone wurden mithilfe einer Pipettenspitze von der Platte entfernt und, ebenfalls unter Selektion, als monoklonale Zellabkömmlinge kultiviert und anschließend auf die Expression der Zielproteine untersucht. Einzelne Zellklone mit

hinreichender Expression der zu untersuchenden Proteine wurden dann für die weiteren Experimente herangezogen. Als Kontrolle dienten in gleicher Weise produzierte Zellklone mit dem entsprechenden leeren Vektor.

## 2.3 Proteinanalytische Methoden

### 2.3.1 Herstellung von Zelllysaten aus adhärennten Zellen

Zur Untersuchung zellulärer Proteine wurde ein Lysepuffer mit dem ionischen Detergenz Triton-X-100 verwendet. Die zu lysierenden Zellkulturschalen wurden vor der Lyse einmal mit eisgekühltem PBS gewaschen und dann mit einem entsprechendem Volumen Lysepuffer versetzt. Das Zelllysate wurde anschließend in ein Eppendorfgefäß gegeben und durch mehrmaliges Suspendieren oder Vortexen homogenisiert. Zelltrümmer und unlösliche Zellbestandteile wurden für vier Minuten bei 14000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und zur Proteinbestimmung, Herstellung von Totallysaten oder zur Immunpräzipitation verwendet.

Lysepuffer:	50 mM Hepes pH 7.5 150 mM NaCl 5 mM EDTA pH 8.0 10 % Glycerin 0.1 % Triton-X-100
jeweils frisch zugeben:	10 µg/ml Aprotinin 2 mM PMSF 10 mM Natriumtetrapyrophosphat 100 mM Natriumfluorid 1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### 2.3.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der Bradford-Assay von Biorad nach Angaben des Herstellers verwendet (Bradford, 1976). Durch Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an die vorhandenen Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm stellt ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung dar. Die Färbung der

entsprechend verdünnten Lysate wurde bei 595 nm gemessen und auf den BSA-Standard (50 - 1000 µg Protein) bezogen.

### **2.3.3 Immunpräzipitation von Proteinen**

Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch an den Fc-Anteil einer Reihe von Immunglobulinen bindet. Die Antigen-Bindungsstelle bleibt frei. Protein G ist ein aus *Clostridium difficile* isoliertes Membranprotein, das bestimmte Subklassen von Immunglobulinen kovalent über die Fc-Einheit bindet. Durch die kovalente Kopplung von Protein A und G an Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes, Antikörper + Protein, ermöglicht (Hjelm et al., 1972, Chenais et al., 1977).

Zur Immunpräzipitation wurden je 35 µl Protein A- und Protein G-Sepharose und 1-5 µg MAK oder PAK in einem 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1000 µl HEPES 20mM pH 7.5 bei 4 °C für 20 min auf dem Drehrad präinkubiert. Anschließend wurde die Lösung abzentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 10 min) und die HEPES-Lösung verworfen. Die Lysate wurden in entsprechendem Volumen zu den an die beads gebundenen Antikörpern gegeben und erneut für ca. 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden bei 14000 rpm für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit HNTG-Puffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Triton-X-100, 10 % Glycerin) gewaschen und in ca. 100 µl 1x Laemmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein entsprechendes SDS-Page-Gel wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert.

### **2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach dem Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Das Detergenz SDS komplexiert Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur und versieht sie mit einer negativen Ladung, die ihre Wanderung im Gel entsprechend ihres Molekulargewichts bestimmt. Es wurden 7.5 oder 10 %-ige SDS-Polyacrylamidgele sowie Gradientengele (4-15 %) verwendet. Die Trenngele bestanden aus dem entsprechenden Anteil der Acrylamidlösung (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid), 1.5 M Tris/HCl pH 8.8, 2 % SDS und H<sub>2</sub>O.

Das 3 %ige Sammelgel bestand aus 30/0.8 % Acrylamidlösung, 0.5 M Tris/HCl pH 6.8, 2 % SDS und H<sub>2</sub>O. Die Polymerisationsreaktion wurde durch Zugabe von 10 % APS und TEMED gestartet.

Die Elektrophorese erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Die Gele wurden zum Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

Als Molekulargewichtsstandard wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

Protein	Molekulargewicht (in kDa)
Myosin	200.00
β-Galaktosidase	116.25
Phosphorylase b	97.40
BSA	66.20
Ovalbumin	45.00
Carboanhydrase	31.00
Trypsin-Inhibitor	21.50
Lysozym	14.40
Aprotinin	6.50

### 2.3.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Elektrophorese aus den SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen transferiert (Gershoni & Palade, 1983). Der Transfer erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit Transblot SDS für 2 h bei 0.8–1.2 mA in einer “Semidry”-Blotkammer. Nach erfolgtem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2/1 in 2 % (w/v) TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtsstandards markiert und die Membran mit NET (1x) entfärbt.

### 2.3.6 Immunoblot

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrocellulosemembran zu verhindern, wurde diese vor der Inkubation für 1 h bei RT mit 0.2 % Gelatine in NET inkubiert und danach dreimal für je 10 min. mit NET gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Primär-Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden Angaben der Hersteller entsprechend oder standardmäßig 1:500 bzw. 1:1000 in NET/Gelatine 0,2 % verdünnt. Die Antikörperlösungen wurden bei 4 °C gelagert und konnten mehrfach verwendet

werden. Der Blot wurde für mindestens 1h bei 8°C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach dreimal für 10 min mit NET gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei 8°C mit dem entsprechenden mit NET/Gelatine verdünnten Sekundär-Antikörper inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte Spezies-spezifische Antikörper verwendet.

Nach erneutem dreimaligem Waschen für je 10 min mit NET/Tween 0,1 % und einmal für 10 min mit PBS/Tween 0,1 % wurden die antikörpermarkierten Banden mithilfe des ECL-Verfahrens sichtbar gemacht.

### **2.3.7 Detektion mit dem ECL-Verfahren**

Die Detektion der markierten Proteine erfolgte mit dem ECL-Chemilumineszenz-Kit. Das an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Enzym Peroxidase setzt das Substrat Wasserstoffperoxid um, der dabei freier werdende Sauerstoff katalysiert die Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu. Die Oxidation transferiert Luminol auf ein höheres Energieniveau. Bei dem Rückfall in den Grundzustand wird Energie als Chemilumineszenz frei. Durch die Oxidation von Luminol in Gegenwart von "Enhancern" wird die Menge des emittierten Lichtes erhöht und zugleich die Emission verlängert (Thorpe et al., 1985).

Zur Detektion wurde der Blot in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 im Dunkeln unter Schwenken für 1 min inkubiert. Anschließend wurde der Blot auf Whatman 3 mm kurz getrocknet, auf polyethylenbeschichtetes Papier gelegt und mit Cellophan luftblasenfrei abgedeckt. Der Blot wurde dann sofort auf einem Röntgenfilm in Abhängigkeit von der Stärke der Chemilumineszenz für verschiedene Zeiten (5 sek – 1 h) exponiert. Für eine eventuelle zweite Inkubation des Blots konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in Striplösung (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2 % SDS) bei 55 °C für 30 min. entfernt werden. Anschließend wurde der Blot in NET gewaschen, erneut geblockt und wie oben beschrieben mit Primär- und Sekundär-Antikörpern behandelt.

## **2.4 Immunhistochemische Detektion**

### **2.4.1 Kultivierung und Fixierung von Zellen auf 4-well-chamber-slites**

Zur Immunomarkierung wurden die entsprechenden Zellen ausgezählt und in der benötigten Dichte auf 4-well-chamber-slites für ca. 24 h in 0.5 ml Zellkulturmedium kultiviert. Zur Fixierung wurden die Zellen zunächst 3 x für 5 min. mit PBS gewaschen und dann mit Paraformaldehyd (4 %) für 15 min. inkubiert. Anschließend wurden die Proben für eine Minute mit Triton (0,1 %) permeabilisiert .

### **2.4.2 Einzel-Immunomarkierung**

Um unspezifische Antikörper-Bindung zu verhindern, wurden die Zellen zunächst für ca. 1 h mit „AURION“-basic-blocking-solution in einem Verhältnis von 1:10 in PBS blockiert. Über Nacht wurden die Proben bei 4 °C mit den entsprechenden spezifischen primären Antikörpern inkubiert (Konzentration 5 µg/ml). Im Anschluss an die Inkubation mit den primären Antikörpern folgten drei Waschschrte für je 5 min. mit PBS. Dann erfolgte die Detektion der gebundenen primären Antikörper. Hierzu wurden aus der Ziege gewonnene Immunglobuline G, gerichtet gegen Kaninchen oder Maus und konjugiert mit Dichlortriazinyl Aminofluoreszein (DTAF) oder Cy3, in einer Verdünnung von 1:100 bzw. 1:200 verwendet. Die Zellen wurden für 1 h mit den entsprechenden Antikörpern unter Lichtabschluss inkubiert. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellkerne mit DAPI (1:10000 in PBS) für 30 sek. gegengefärbt, anschließend noch einmal mit PBS gewaschen und mithilfe von VECTASHIELD eingedeckelt. Als Kontrollen für die durchgeführten Färbungen wurden Zellproben ohne den ersten Antikörper inkubiert bzw. der erste spezifische Antikörper durch Kaninchen- bzw. Maus-Ig G ersetzt. In diesen Kontrollen konnte keinen spezifischen Anfärbungen beobachtet werden.

### **2.4.3 Doppel-Immunomarkierung**

Um gleichzeitig verschiedene Proteine sichtbar zu machen, wurden aus unterschiedlichen Tierarten gewonnene primäre Antikörper verwendet (hier aus Kaninchen und Maus). Wenn möglich wurden der Einfachheit halber die verschiedenen

Antikörper gemischt und gleichzeitig inkubiert. Die gebundenen primären Antikörper wurden dann mittels einer entsprechenden Mischung von sekundären Ziegen-Immunglobulinen G, konjugiert mit verschiedenen Fluorochromen (DTAF und Cy3), sichtbar gemacht. Die Inkubationen und Waschschriffe sowie die Gegenfärbung mit DAPI erfolgten nach dem oben aufgeführten Protokoll der Einfach-Immunomarkierung.

#### **2.4.4 Mikroskopie und Bildbearbeitung**

Die markierten Zellpräparate wurden mit einem Zeiss Axioskop Mikroskop, ausgestattet mit den entsprechenden Filtern, untersucht. DAPI- und Fluochrom-Markierungen wurden mit einer AxioCam Digitale Mikroskop Kamera und einer AxioVision Multikanal Bildbearbeitung digitalisiert. Die digitale Bearbeitung der Bilder wurde mit Photoshop 6.0 durchgeführt.

### **2.5 Biologische Zellkulturassays**

#### **2.5.1 Untersuchung des Wachstums von Zellen im MTT-Wachstumsassay**

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Zellen wurde die von Mosmann, 1983, für Zellen des Immunsystems beschriebene Methode auf adhärenente Zellen übertragen. Der Test misst die Aktivität der zellulären Mitochondrien und bestimmt damit die Menge der lebenden Zellen. Das Substrat MTT (Thiazolblau; 3-[Dimethylthiazolyl-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid) dringt in die Zellen ein und wird durch Aufbrechen des Tetrazoliumringes von den Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien in ein alkohollösliches blaues Formazanprodukt umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch mit einem ELISA-Lesegerät bestimmt werden kann.

Zum Test wurden 3000 Zellen auf Mikrotiterplatten (96-wells) in 100 µl Medium in Mehrfachbestimmung ausgesät. Es wurden Wachstumskurven über 6-10 Tage aufgenommen, dabei wurde alle 48 h eine Platte gemessen. Zur Messung wurde in jedes well 25 µl MTT-Lösung (2 mg/ml in PBS) gegeben und für 2,5 h bei 37 °C und 5 % Co<sub>2</sub> inkubiert. Zur Lyse der Zellen und Lösen des Formazanprodukts wurden 150 µl Isopropanol/1 N HCl hinzugegeben, und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und

Abpipettieren suspendiert. Die Messung erfolgte bei 570 nm (OD<sub>570</sub>) und einer Referenzwellenlänge von 690 nm (OD<sub>690</sub>) im Elisa-Lesegerät.

### **2.5.2 Untersuchung der Koloniebildung von Zellen im Limited-Dilution-Assay**

Ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Tumorigenität von Tumorzellen stellt die Fähigkeit dar, aus vereinzelt Zellen ohne Kontakt zueinander wachstumsfähige Kolonien zu generieren. In diesem Assay wurde diese Fähigkeit der Zellen zur Koloniebildung untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in sehr geringen Konzentrationen (250, 500 bzw. 1000 Zellen pro 10-cm-Schale) in 8 ml Zellkulturmedium ausgesät, und das Wachstum der Zellen für ca. 10-14 Tage beobachtet. Nach 14 Tagen wurde das Medium entfernt und die gebildeten Kolonien für 1 min mit Kristallviolett angefärbt, überschüssige Farblösung wurde mit Wasser abgewaschen. Die gefärbten Zellkulturschalen wurden im Lichtmikroskop untersucht und fotografiert. Mithilfe des Assays kann die für die Zelllinie spezifische minimal benötigte Konzentration zur Koloniebildung bestimmt werden.

### **2.5.3 Untersuchung der Koloniebildung von Zellen im Soft-Agar-Assay**

Eine weitere Eigenschaft von malignen Tumorzellen besteht darin, ohne Kontakt zu einem spezifischen Untergrund Kolonien zu bilden und somit autonomes Wachstum zu betreiben. Um diese Fähigkeit in den zu charakterisierenden Zelllinien zu untersuchen, wurde der Soft-Agar-Assay angewendet. Hierbei wurden zunächst ca. 4 ml eines 1 % igen Bottom-Agars auf eine 6-cm-Zellkulturschale gegeben. Auf den ausgehärteten Bottom-Agar wurde eine vorher mithilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählte Menge von in Medium suspendierten Zellen in einem Volumen von unter 200 µl pipettiert und umgehend mit 5 ml eines entsprechend mit Medium verdünnten 0,4 % igen Top-Agars überschichtet. Wahlweise konnten die Zellen in der entsprechenden Menge auch mit dem Top-Agar kurz gemischt und dann auf den Bottom-Agar gegeben werden. In verschiedenen Ansätzen wurden ausgezählte Zellmengen zwischen 1000 und 10000 Zellen pro 6-cm-Schale in 5 ml Top-Agar eingesetzt.

Zum Aushärten des Top-Agars wurde die Platte für ca. 20 min auf geradem Untergrund bei Raumtemperatur belassen und anschließend im Inkubator bei 37 °C ebenfalls auf



gerader Fläche für bis zu 21 Tage inkubiert. Im Verlauf wurden das Zellwachstum beobachtet und unter dem Lichtmikroskop analysiert und fotografiert, alle drei Tage erfolgte die Zugabe von ca. 1 ml Soft-Agar-Medium, gegebenenfalls auch die Auffüllung der Platten mit wenig Top-Agar.

Bottom Agar, 1 %:

25 ml Agarose (Firma GIBCO, gelöst in bidestilliertem Wasser), 2 %ig  
+ 25 ml Soft-Agar Medium

Top Agar, 0,4%:

10 ml Agarose (Firma GIBCO, gelöst in bidestilliertem Wasser), 2%ig  
+ 40 ml Soft-Agar Medium

Um den jeweiligen Agar flüssig zu halten, sowie die Zerstörung der Zellen und die Denaturierung der Zusätze durch Hitze zu verhindern, wurde der Agar auf max. 55 °C erhitzt während die restlichen Zusätze streng bei 37 °C gewärmt wurden.

#### **2.5.4 Untersuchung der Zellen im In-Vitro-Wounding-Assay**

Um die Invasivität von Tumoren zu beurteilen, ist die Fähigkeit von Zellen, ihren Zellverband zu verlassen, maßgebend. Um sich der Charakterisierung dieser Eigenschaft der Zelllinien in-vitro zu nähern, wurde auf den In-Vitro-Wounding-Assay zurückgegriffen. Die Zellen wurden auf 6-cm-Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium durch Medium mit Mitomycin C in einer Endkonzentration von 10 µg/ml ersetzt und die Zellen wurden für zwei Stunden in diesem Medium belassen. Durch Blockade des Spindelapparates verhindert Mitomycin C die weitere Zellteilung der behandelten Zellen.

Mit einer Pipettenspitze wurden nun auf einer Platte mehrere „Kratzer“ gezogen. Anschließend wurden die Platten einmal mit PBS gewaschen, das Zellkulturmedium ausgetauscht und die Platten für mindestens 24 h im Inkubator belassen. Im Verlauf wurde beobachtet, ob die Zellen in der Lage waren, in den freien Raum auf der Zellkulturschale zu migrieren und die entsprechenden Stellen erneut zu bewachsen. In verschiedenen Zeitabständen wurden die Platten analysiert und fotografiert, um das Migrationsverhalten zu dokumentieren.

### **3. ERGEBNISSE**

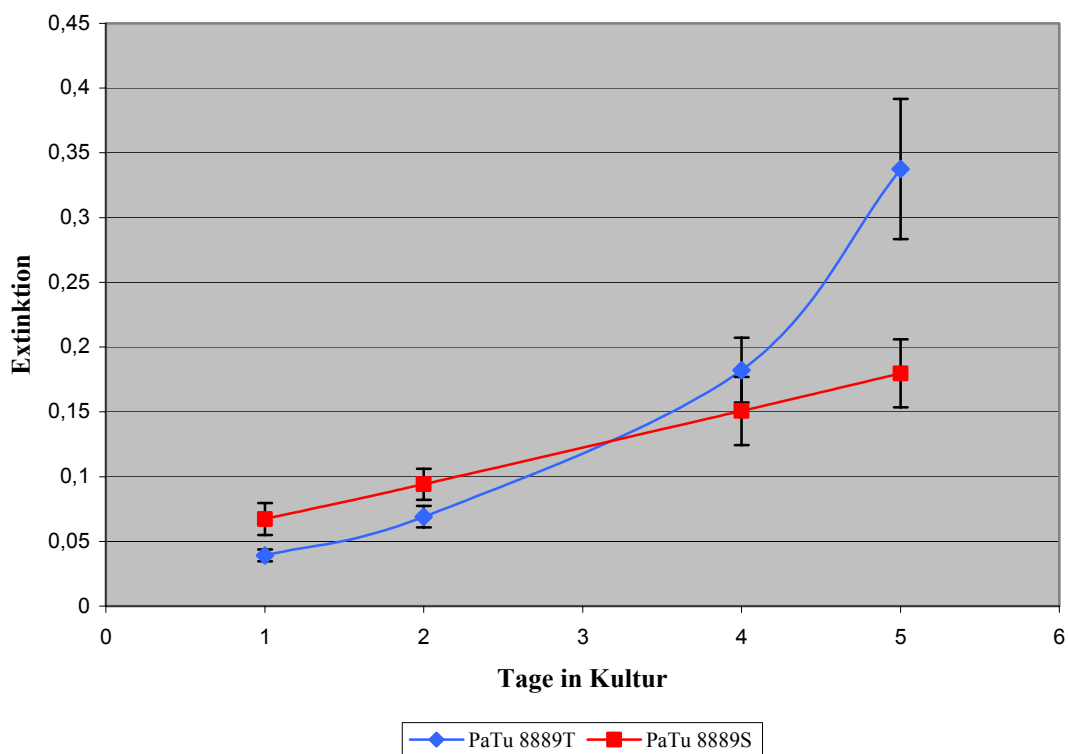
Um die Aggressivität von Tumoren zu beurteilen und Prognosen über die Malignität dieser Tumoren abgeben zu können, ist die Untersuchung verschiedener Parameter des Tumorwachstums erforderlich. Zu diesen Parametern zählen zum Beispiel eine abnorme Zellmorphologie mit Differenzierungsverlust, eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit, autonomes Wachstum mit Verlust der Kontaktinhibition und Wachstumskontrolle durch den Zellverband, die Fähigkeit zur Migration und somit zur Metastasenbildung und vieles mehr. Gegenstand der Forschung ist seit langer Zeit die Beobachtung morphologischer Kriterien und die Einschätzung ihrer Bedeutung für das Tumorwachstum. Weiteres Ziel ist es, die beobachteten Eigenschaften mit zellbiologischen und proteinchemischen Veränderungen im Zellstoffwechsel und an der Zelloberfläche zu korrelieren, um die malignem Wachstum zugrundeliegenden Mechanismen aufzudecken und prognostische Parameter zu entwickeln. Zunächst charakterisierten wir daher vergleichend die Wachstums- und Migrationseigenschaften von PaTu 8889S und PaTu 8889T. Dafür standen uns diverse zellbiologische Assays zur Verfügung.

#### **3.1 Charakterisierung der Zelllinien im zellbiologischen Assay**

Die Zelllinien PaTu 8889S und PaTu 8889T weisen, obwohl sie aus derselben Metastase eines Pankreaskarzinoms stammen und daher eine nahezu gleiche genetische Ausstattung vermuten lassen, unterschiedliche Wachstumseigenschaften und morphologische Charakteristika auf. Während PaTu 8889S Passagezeiträume von etwa 5-8 Tagen zeigt, waren für PaTu 8889T alle 3-5 Tage Passagen notwendig. Morphologisch stellen sich unter dem Lichtmikroskop die Zellen der Linie PaTu 8889S als eher rundliche, in größeren Zellplaques aneinander haftend wachsende Zellen dar, während die Zellen der Linie PaTu 8889T ohne Kontakt zueinander wachsen, häufig Zellausläufer bilden und sich schnell über die gesamte Zellkulturschale verteilen. Ziel des ersten Arbeitsteils war es, diese Unterschiede in Morphologie und Wachstumseigenschaften in zellbiologischen Assays zu charakterisieren.

### 3.1.1 Untersuchung der Wachstumseigenschaften im MTT-Wachstumsassay

Die Wachstumsgeschwindigkeiten von PaTu 8889S und PaTu 8889T quantifizierten mithilfe des MTT-Wachstumsassays. Dieser Test misst die Stoffwechselaktivität der zellulären Mitochondrien und bestimmt damit die Menge der lebenden Zellen. Das Substrat MTT (Thiazolblau; 3-[Dimethylthiazolyl-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid) dringt in die Zellen ein und wird durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien in ein alkohollösliches blaues Formazanprodukt umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wird. Zur Untersuchung dienten 3000 Zellen pro 96-well über einen Untersuchungszeitraum von 5 Tagen. Nach einer Inkubationszeit von 2 h erfolgte alle 48 h eine Messung (Abb.5).



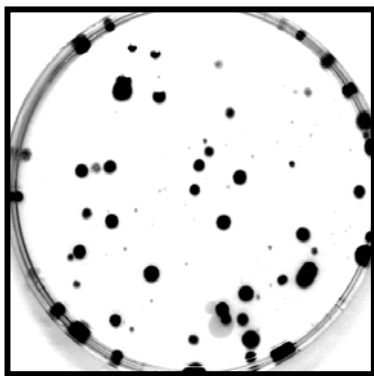
**Abb.5 Untersuchung der Proliferationsgeschwindigkeit von PaTu 8889S und PaTu 8889T im MTT-Wachstumsassay**

Während die Zelllinie PaTu 8889S von Beginn an stetig mit gleicher Geschwindigkeit proliferiert, zeigen die Zellen der Linie PaTu 8889T eine exponentiell ansteigende Proliferationsrate. Nach Ablauf von 5 Tagen übersteigt die Proliferation von PaTu 8889T die der Schwesterzelllinie signifikant.

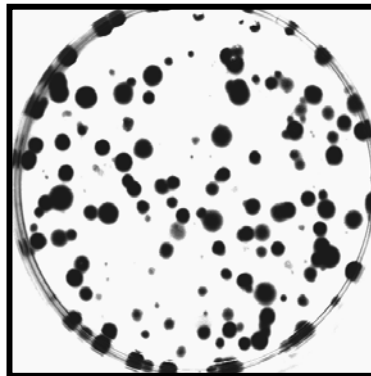
Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Proliferationsgeschwindigkeit der beiden Tumorzelllinien: Während die Zellen der Zelllinie PaTu 8889S von Beginn an eine nahezu lineare Proliferationsrate mit langsamer Wachstumsgeschwindigkeit zeigten, wuchsen die Zellen der Schwesterzelllinie PaTu 8889T im Laufe der Messungen exponentiell ansteigend. Nach 5 Tagen des Untersuchungszeitraumes unterschieden sich die Proliferationsraten der Tumorzelllinien signifikant.

### 3.1.2 Untersuchung der Koloniebildung im Limited-Dilution-Assay

Als weiterer Parameter zur Charakterisierung der Tumorigenität der untersuchten Tumorzellen wurde im Limited-Dilution-Assay die Fähigkeit zur Koloniebildung beobachtet. Dieser Assay untersucht, ob die zu analysierenden Zellen in der Lage sind, in Verdünnungen, die den Kontakt der Zellen untereinander unterbinden, Kolonien zu generieren (Abb.6).



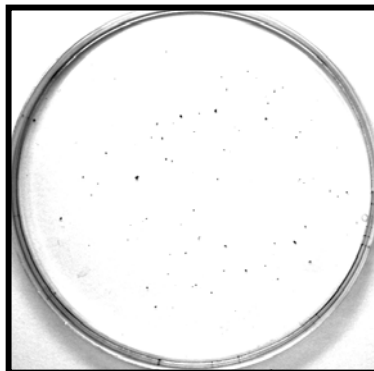
250 Zellen/Schale/14d



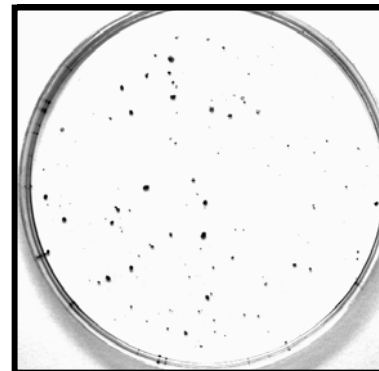
500 Zellen/Schale/14d

#### PaTu 8889T

**Abb. 6a Limited-Dilution-Assay in PaTu 8889T**  
Sowohl bei Konzentrationen von 250 Zellen /Platte als auch 500 Zellen/Platte zeigt PaTu 8889T deutliches Koloniewachstum nach 14 Tagen Inkubationszeit.



250 Zellen/Schale/14d



500 Zellen/Schale/14d

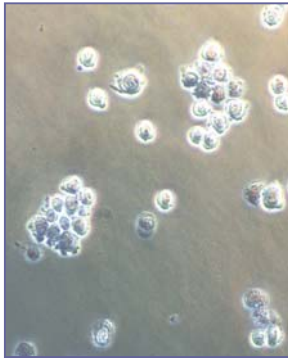
#### PaTu 8889S

**Abb. 6b Limited-Dilution-Assay in PaTu 8889S**  
Im Gegensatz zu PaTu 8889T zeigt PaTu 8889S aus keiner Ausgangskonzentration Koloniewachstum nach 14 Tagen Inkubationszeit.

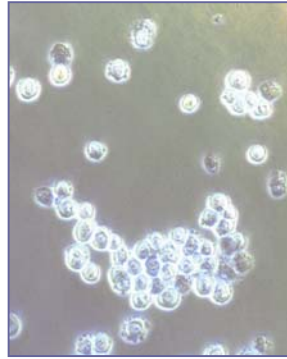
Auch in diesem Assay zeigten sich Unterschiede zwischen den verwandten Tumorzelllinien PaTu 8889S und 8889T. In ausgezählten Konzentrationen von 250 und 500 Zellen pro 10-cm Zellkulturschale zeigte PaTu 8889T nach 14 Tagen deutliche färbbare Kolonien (Abb.6a). PaTu 8889S hingegen konnte im gleichen Zeitraum kaum Koloniewachstum aufweisen. Es wurden zwar im Lichtmikroskop kleinere Zellansammlungen von lebenden Zellen sichtbar, jedoch waren diese erheblich kleiner als die der Schwesterzelllinie PaTu 8889T und ließen sich kaum in der Kristallviolett-Färbung sichtbar machen. (Abb.6b).

### **3.1.3 Untersuchung der Koloniebildung im Soft-Agar-Assay**

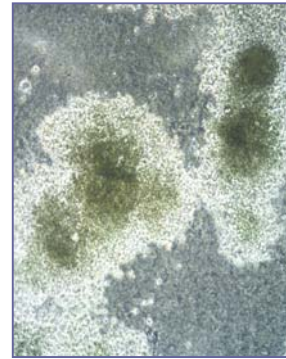
Um die Wachstumseigenschaften der Tumorzellen weiter zu charakterisieren, untersuchten wir im Soft-Agar-Assay die Bildung von Zellkolonien bei fehlendem Kontakt zum Untergrund. Dazu wurden die Zellen in ausgezählten Konzentrationen in einen Weichagar eingegossen und in bis zu 21 Tagen auf Koloniebildung untersucht. Die Ergebnisse zeigten wiederum eine Differenz zwischen den zwei Zelllinien. Die Zellen der Linie PaTu 8889T zeigten bereits in den ersten 24 h der Inkubationszeit deutliche Zellteilung (Abb.7a). Neben dreidimensional wachsenden Kolonien zeigten sich auch flächige Zellansammlungen. Die Zellen der Linie PaTu 8889S hingegen zeigten zunächst in den ersten 24 h eine Vergrößerung und vakuolige Auftreibung der ausgesäten Zellen, Zellteilung konnte nicht beobachtet werden. Nach etwa 144 h Inkubationszeit und regelmäßigem Mediumwechsel degenerierten die PaTu 8889S-Zellen zunehmend bis letztendlich nach MTT-Färbung keine lebenden Zellen mehr nachweisbar waren (Abb.7b).

**PaTu 8889T**

24h



72h



&gt;144h

**Abb. 7a Soft-Agar-Assay in PaTu 8889T**

Ohne Kontakt zum Untergrund kommt es in PaTu 8889T zu deutlichem sowohl flächigen als auch dreidimensionalem Koloniewachstum.

**PaTu 8889S**

24h



72h



&gt;144h

**Abb. 7b Soft-Agar-Assay in PaTu 8889S**

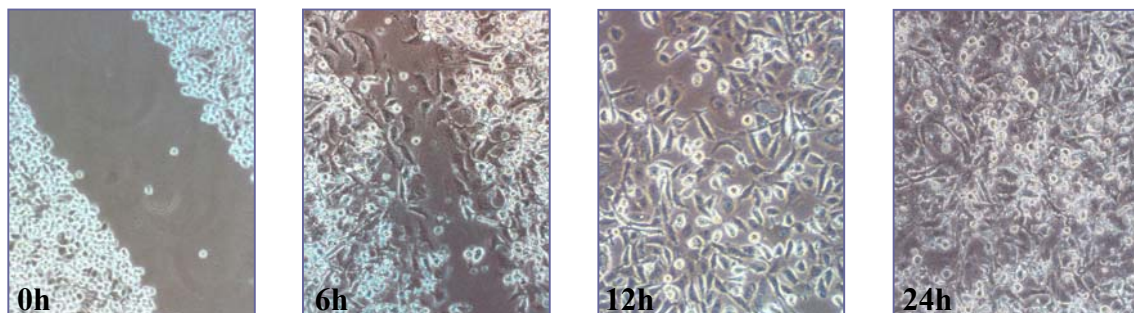
Ohne Kontakt zum Untergrund kommt es in PaTu 8889S zu keinem Koloniewachstum. Nach 72 h zeigt sich eine Ballonierung der Zellen, nach mehr als 144 h Inkubation kommt es zu einer Degeneration der PaTu 8889S-Zellen.

**3.1.4 Untersuchung der Migrationseigenschaften im In-Vitro-Wounding-Assay**

Um die Invasivität von Tumoren zu beurteilen, ist die Fähigkeit von Zellen, ihren Zellverband zu verlassen, maßgebend. Diese Eigenschaft der Zelllinien charakterisierten wir mit dem In-Vitro-Wounding-Assay. Um die Zellteilung lebender Zellen zu unterbinden inkubierten wir die Zellen für zwei Stunden mit Mitomycin C. Es sollte untersucht werden, ob die Zellen durch Migration ihre Anheftungsstelle auf der Zellkulturschale verändern können. Auch hier zeigten die Zelllinien unterschiedliche

Eigenschaften. Bereits in den ersten 6 h der Inkubation zeigte die Zelllinie PaTu 8889T eine deutliche Migration in den freien „scratch“. Hierbei begann die „Besiedlung“ des freien Platzes von verschiedenen Seiten und ließ keine Regelmäßigkeit erkennen. Nach zirka 12 h war bereits eine dünne Zellschicht sichtbar, nach 24-48 h war der „scratch“ nicht mehr zu differenzieren (Abb.8a). PaTu 8889S dagegen zeigte nach zirka 12-24 h Ausbuchtungen und „Brücken“. Die Zellen schienen sich auf den freien Platz übereinander vorzuschieben. Die Zellen verließen jedoch ihren Zellverband nicht und zeigten keine migrierende Einzelzellen. Ein Schluss der Zelldecke auf der Schale war nicht zu beobachten (Abb.8b).

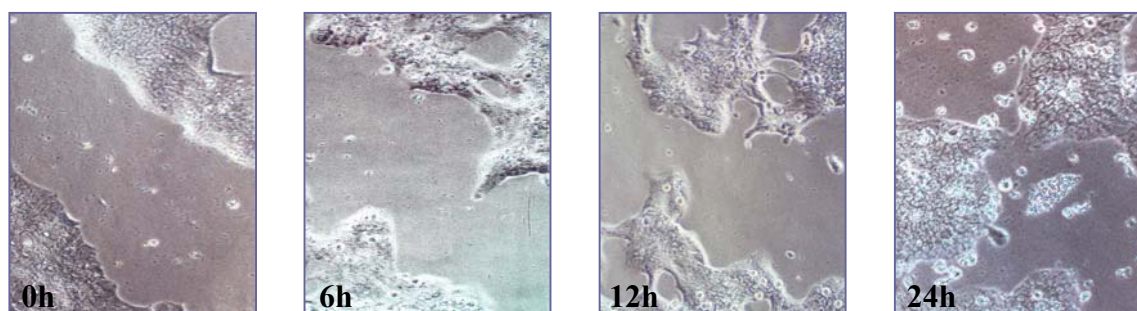
### PaTu 8889T



**Abb. 8a In-Vitro-Wounding-Assay in PaTu 8889T**

Die Zellen der Zelllinie PaTu 8889T zeigen bereits innerhalb der ersten 6 h eine deutliche Migration auf der Zellkulturschale. Nach 24 h ist der freie Raum auf der Schale wieder vollständig ausgefüllt.

### PaTu 8889S



**Abb. 8b In-Vitro-Wounding-Assay in PaTu 8889S**

Die Zelllinie PaTu 8889S zeigt lediglich eine Brückenbildung über dem Scratch. Die Zellen verlassen ihren Zellverband nicht. Auch nach 24 h kann keine Kontinuität hergestellt werden.

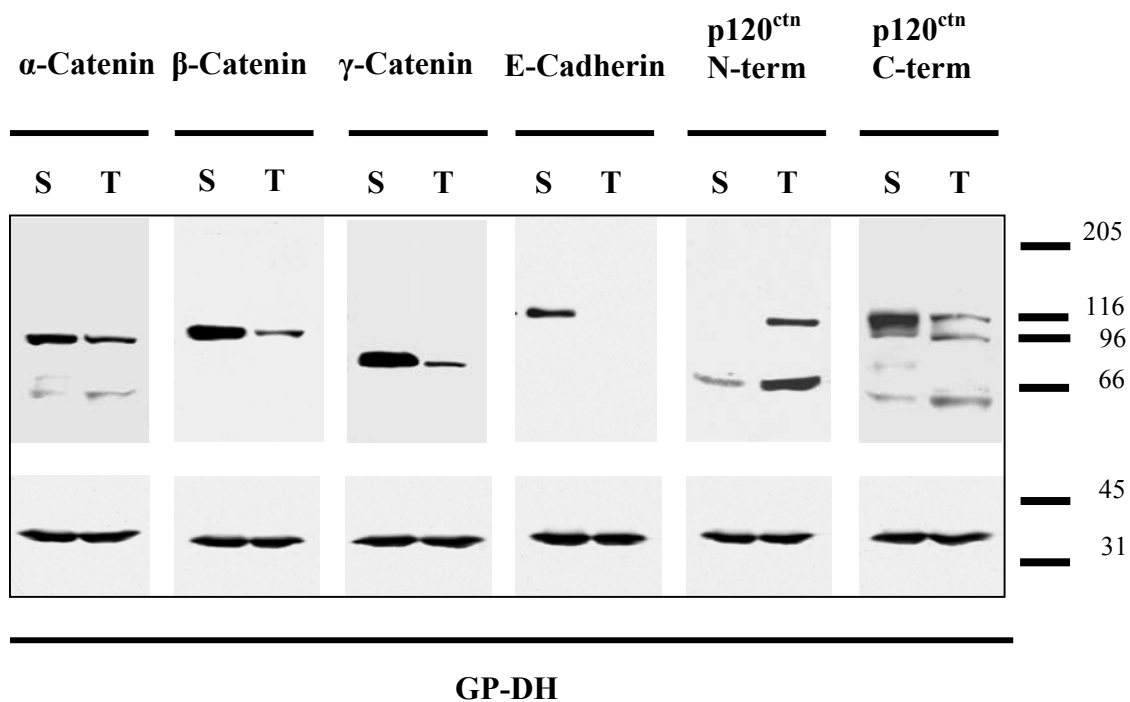
### **3.2 Charakterisierung des Cadherin/Catenin-Komplexes in den Zelllinien PaTu 8889S und PaTu 8889T**

Da die beiden zu untersuchenden Zelllinien aus einer Tumormetastase stammen, und daher eine nahezu identische genetische Ausstattung vermuten lassen, sie sich aber dennoch in Zellwachstum und Migrationseigenschaften deutlich unterscheiden, vermuteten wir, dass die im Assay zu beobachteten Unterschiede auf wenige genetische oder epigenetische Veränderungen zurückzuführen sind. Besonders die Beobachtung, dass PaTu 8889T im Gegensatz zu PaTu 8889S keine Zell-Zellkontakte ausbildet und sich im In-Vitro-Wounding-Assay einzelne Zellen aus dem Zellverband lösen können, ließ uns die Ursachen für diese Verhaltensweisen an der Zelloberfläche und insbesondere bei der Generierung von Zell-Zellkontakten vermuten. Daher untersuchten wir in den Tumorzelllinien PaTu 8889T und PaTu 8889S den Cadherin/Catenin-Komplex, einen zentralen Baustein von Zell-Zellkontakten in epithelialen Zellverbänden.

#### **3.2.1 Analyse der Zusammensetzung des Cadherin/Catenin-Komplexes in PaTu 8889S und PaTu 8889T im Western Blot**

Um die Funktionalität des Cadherin/Catenin-Komplexes zu überprüfen und um die Expression der Bestandteile vergleichend zu charakterisieren, isolierten wir Triton-Zellysate und untersuchten diese nach Auftrennung im Polyacrylamid-Gel mithilfe von Western Blot-Analysen. Es wurde deutlich, dass sich die beiden Zelllinien hier in einer entscheidenden Eigenschaft unterscheiden. Während in PaTu 8889S das Zelladhäsionsprotein E-Cadherin stark exprimiert wurde, fehlte es in den PaTu 8889T-Zellen vollständig. Weitere Untersuchungen des Cadherin/Catenin-Komplexes zeigten, dass in beiden Zelllinien sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin exprimiert wurden, wenn auch in den Zellen der Linie PaTu 8889T in geringerem Ausmaß. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der beiden Zelllinien bot sich im als src-Kinasesubstrat identifizierten und in multiplen Isoformen vorkommenden Protein p120<sup>ctn</sup>. In PaTu 8889S lagen vorwiegend Isoformen der Klassen 3 und 4 vor, während PaTu 8889T eine lange Isoform der Klasse 1 oder 2 ebenso wie eine der Klasse 3 bildete (Abb.9). Eine Differenzierung der Isoformen von p120<sup>ctn</sup>, sowie die Analyse seiner Funktion erfolgte in weiteren Experimenten.





**Abb. 9 Der Cadherin/Catenin-Komplex in PaTu 8889S und PaTu 8889T im Western Blot**

Nur die Zellen der Linie PaTu 8889S exprimieren E-Cadherin. Sowohl PaTu 8889S als auch PaTu 8889T zeigen eine Expression von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin. Während in PaTu 8889T nur zwei verschiedene p120<sup>ctn</sup>-Isoformen zur Darstellung kommen, zeigt PaTu 8889S ein multiples Bandenmuster verschiedener Splice-Varianten.

### 3.2.2 Analyse der Lokalisation der Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes in PaTu 8889S und PaTu 8889T in Immunfluoreszenz-Experimenten

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Experimenten wurde die Integrität des Cadherin/Catenin-Komplexes in den PaTu-Zelllinien untersucht, um zu analysieren, inwieweit der Verlust von E-Cadherin in PaTu 8889T sich auf die Lokalisation der übrigen Bestandteile des Komplexes auswirkt. Hierbei untersuchten wir sowohl die Lokalisation der Einzelbestandteile für sich, als auch deren Kolo-kalisation in Doppelmarkierungsversuchen (Abb.10). Um zwischen den verschiedenen Isoformen von p120<sup>ctn</sup> zu differenzieren, verwendeten wir isoformspezifische, monoklonale Antikörper der Firma Zymed. Der am C-Term ansetzende Antikörper bindet alle vorhandenen Isoformen, mit Hilfe des N-terminalen Antikörpers konnten die Isoformen der Klassen 1 und 2 von den restlichen Unterklassen unterschieden werden. Bei der Beobachtung der Bestandteile des Komplexes bestätigte sich das aus den

Vorexperimenten schon bekannte Fehlen von E-Cadherin in Zellen der Linie PaTu 8889T. In PaTu 8889S wurde E-Cadherin deutlich an der Zellmembran lokalisiert.

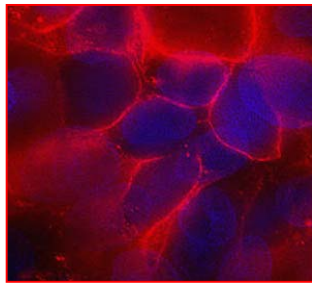
Die Färbungen für  $\beta$ -Catenin zeigten ein anderes Bild. Als ein an E-Cadherin gebundenes Protein des intakten Komplexes zeigte sich  $\beta$ -Catenin in PaTu 8889S mit E-Cadherin an der Zellmembran kolokalisiert (Abb.10a), ein kleinerer Teil befand sich außerdem im Zytosol. In den Zellen der Linie PaTu 8889T bot sich ein völlig anderes Bild:  $\beta$ -Catenin wurde hier kaum an die Membran gebunden, ein deutliches Signal jedoch fand sich im Zytosol. Über eine mögliche Lokalisation im Zellkern, wie sie für  $\beta$ -Catenin ebenfalls beschrieben ist, konnte in diesen Experimenten keine sichere Aussage gemacht werden.

Bei der Untersuchung der Lokalisation der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen zeigte sich in den Zellen der Linie PaTu 8889S eine vor allem membranständige Lokalisation, ein geringerer Teil war im Zytosol lokalisiert. Die Diskriminierung zwischen den Isoformen 1 und 2 einerseits und den Formen 1 bis 4 andererseits zeigte, dass die Isoformen 1 und 2 in PaTu 8889S nur schwach exprimiert wurden. Es zeigte sich eine schwache Färbung der Zellmembran. Die Isoformen 3 und/oder 4 dagegen zeigten nicht nur eine stärkere Expression, sondern auch eine deutliche Lokalisation an der Zellmembran.

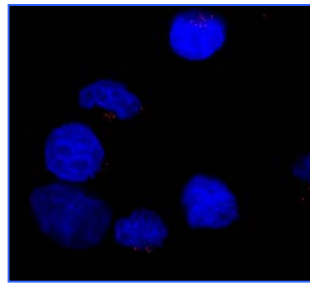
In der Schwesterzelllinie PaTu 8889T fand sich kein p120<sup>ctn</sup> an der Zellmembran, ein Signal wurde allerdings im Zytosol sichtbar. Eine Unterscheidung der p120<sup>ctn</sup>-Isoform-Verteilung war hier bei annähernd gleich starker Fluoreszenz nicht möglich.

**PaTu 8889S**

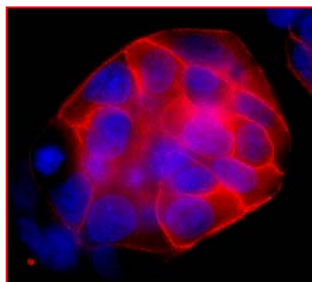
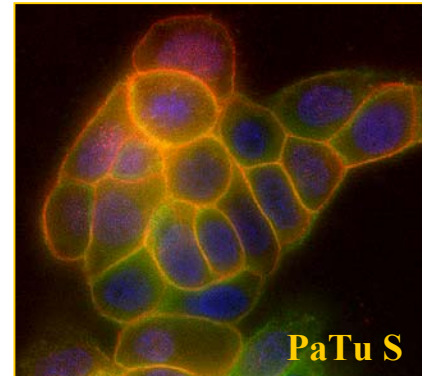
**PaTu 8889T**



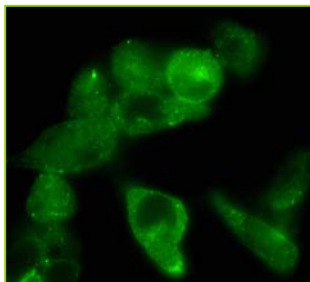
E-Cadherin



E-Cadherin, TL mono/ $\beta$ -Catenin  
SC poly

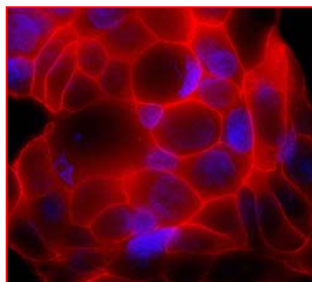


$\beta$ -Catenin

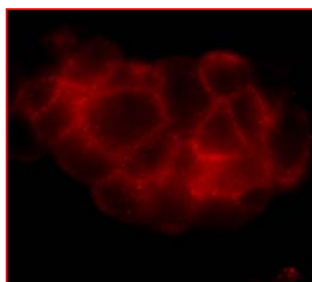
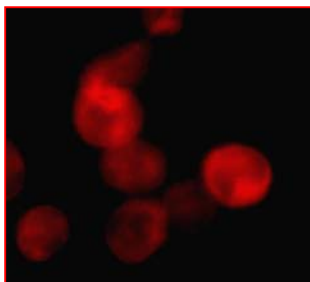


**Abb. 10a Kolokalisation von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin in PaTu 8889S**

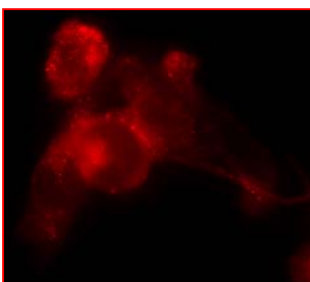
Die Färbung zeigt eine deutliche Kolokalisation von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin an der Zellmembran.



p120<sup>ctn</sup>, C-term, TL



p120<sup>ctn</sup>, N-term, Zymed



**Abb. 10 Der Cadherin-Catenin-Komplex in PaTu 8889T und PaTu 8889S in Immunfluoreszenz-Experimenten**

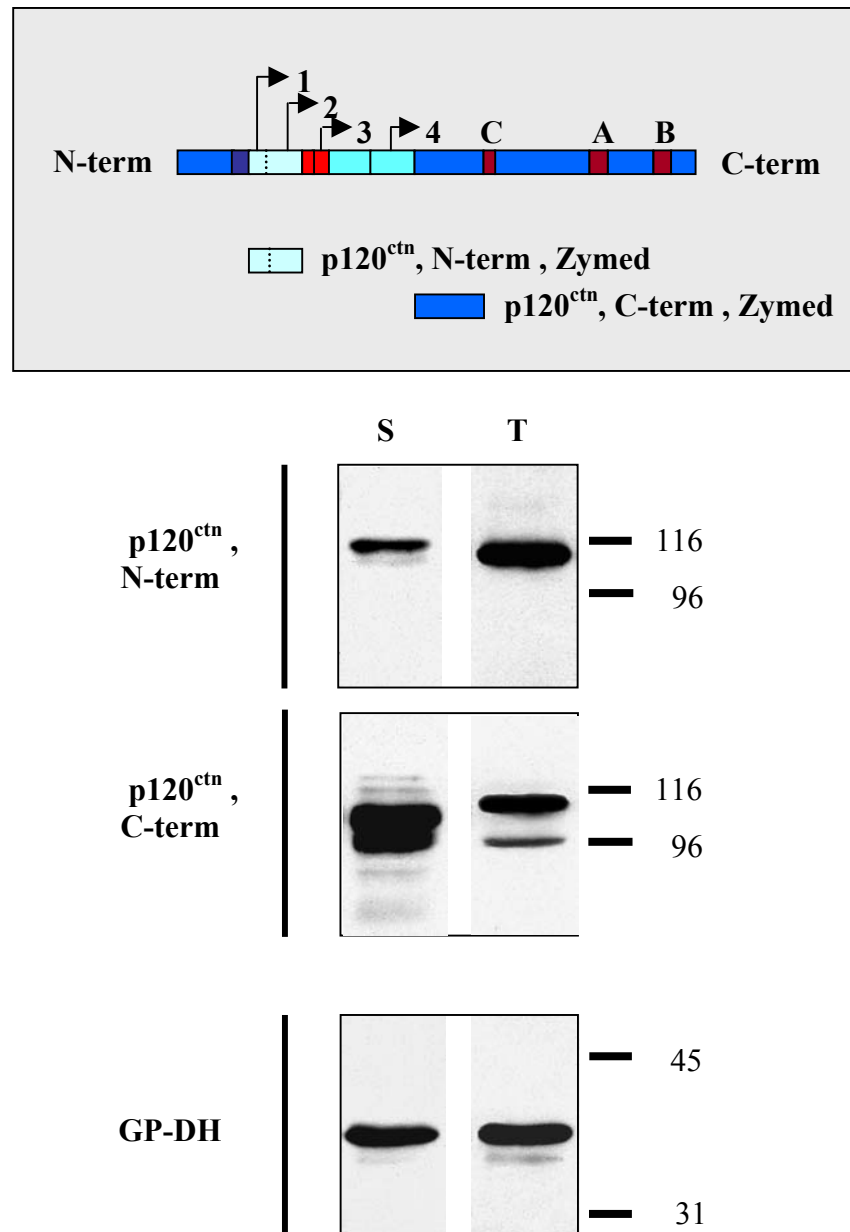
PaTu 8889T zeigt im Gegensatz zu PaTu 8889S keine Färbung von E-Cadherin, die weiteren Bestandteile des Komplexes sind in beiden Zelllinien exprimiert.  $\beta$ -Catenin und p120<sup>ctn</sup>-Catenin zeigen sich in PaTu 8889S überwiegend an der Zellmembran lokalisiert, in PaTu 8889T liegen sie im Zytosol vor. Beide Zelllinien exprimieren p120-Isoformen der Gruppen 1-4 (C-Term) bzw. 1 und 2 (N-Term).

### **3.3 Charakterisierung der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen in den Zelllinien PaTu 8889S und PaTu 8889T**

Bei der Western Blot-Analyse des Cadherin/Catenin-Komplexes wurde neben der Abwesenheit von E-Cadherin in PaTu 8889T beim Vergleich der zwei Zelllinien ein weiterer wichtiger Unterschied deutlich: Die beiden untersuchten Zelllinien differieren in der Expression der Isoformen von p120<sup>ctn</sup>. Aufgrund der bekannten unterschiedlichen Effekte der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen auf einerseits die Stabilität von E-Cadherin an der Zellmembran und andererseits auf z.B. die Induktion von Signaltransduktionskaskaden durch zytosolische oder nukleäre Umverteilung erschien es uns sinnvoll, die verschiedenen Isoformen von p120<sup>ctn</sup> sowie deren Lokalisation in den zwei Schwesterzelllinien zu untersuchen. Zu diesem Zweck analysierten wir in den PaTu-Zelllinien zunächst die auftretenden p120<sup>ctn</sup>-Isoformen mit Hilfe der bereits beschriebenen Antikörper im Western Blot, untersuchten die Bindung spezifischer Isoformen an den Cadherin/Catenin-Komplex durch Immunpräzipitation und betrachteten die Lokalisation von p120<sup>ctn</sup> in Immunfluoreszenzexperimenten.

#### **3.3.1 Analyse der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen in PaTu 8889S und PaTu 8889T**

In der Western Blot-Analyse wurden Triton-Totallysate der zwei Zelllinien verwendet. Untersucht wurde das Zielprotein mithilfe der bereits beschriebenen Antikörper der Firma Zymed, die zwischen den Isoformen 1 und 2 einerseits und den Isoformen 1-4 andererseits unterscheiden. Abbildung 11 zeigt die bereits aufgefallene unterschiedliche Verteilung der Isoformen in den zwei Zelllinien: Während bei der Analyse im Western Blot mit dem N-terminal ansetzenden, und somit die Isoformen 1 und 2 bindenden, Antikörper in der Linie PaTu 8889S eine Bande bei zirka 116 kDa, und dicht darunter eine zweite sehr dünne Bande sichtbar wurde, ließ die Schwesterzelllinie PaTu 8889T nur eine Bande bei zirka 110 kDa erkennen, die allerdings stärker war als die entsprechende in PaTu 8889S. Alle Banden entsprachen dabei Unterformen der Isoformklassen 1 und 2. Die dicht beieinander liegenden Banden in PaTu 8889S lassen an verschiedene C-terminale Exons A-C oder Veränderungen der Laufeigenschaften z.B. durch Phosphorylierung denken.



**Abb. 11 Western-Blot-Analyse der p120<sup>ctn</sup> Isoformen in PaTu 8889S und PaTu 8889T**  
 PaTu 8889T exprimiert lediglich zwei p120<sup>ctn</sup>-Isoformen der Gruppen 1 oder 2 bzw. der Gruppe 3.  
 PaTu 8889S zeigt eine große Variationsbreite verschiedener Isoformgruppen der Klassen 1-4.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich in Western Blot mit dem C-terminalen Antikörper, der alle vier möglichen N-Terminalen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen erfasst. Auch hier wurde in der Zelllinie PaTu 8889S eine ganze Palette unterschiedlicher Isoformen sichtbar, die zum Teil nicht exakt voneinander zu trennen waren. Zwei schwächere Banden bei und

oberhalb von 116 kDa waren zu erkennen, bei denen es sich um die bereits im mit dem N-terminalen Antikörper erkannte Isoform 1 oder 2, sowie um eine offenbar im ersten Blot unerkannt gebliebene Isoform der Klasse 1 oder 2 handelte, die oberhalb von 116 kDa zu erkennen ist. Daneben wurden zwei starke Banden bei zirka 106 und 96 kDa sichtbar, darunter noch weitere schwächere Banden unterhalb von 96 kDa. Da diese Banden im Blot mit dem N-terminal ansetzenden Antikörper nicht zu sehen waren und aufgrund der Größenverhältnisse, lassen diese Formen an solche der Gruppen 3 und vermutlich auch 4 denken.

In der Linie PaTu 8889T gestaltete sich das Bild wie schon im vorherigen Blot einfacher: Neben der bereits im ersten Blot erkannten Bande bei zirka 110 kDa wurde nur eine einzige weitere Isoform bei etwa 96 kDa sichtbar. Diese repräsentierte vermutlich eine Isoform der Klasse 3, das Signal zeigte sich schwächer als das der Isoform 1 oder 2.

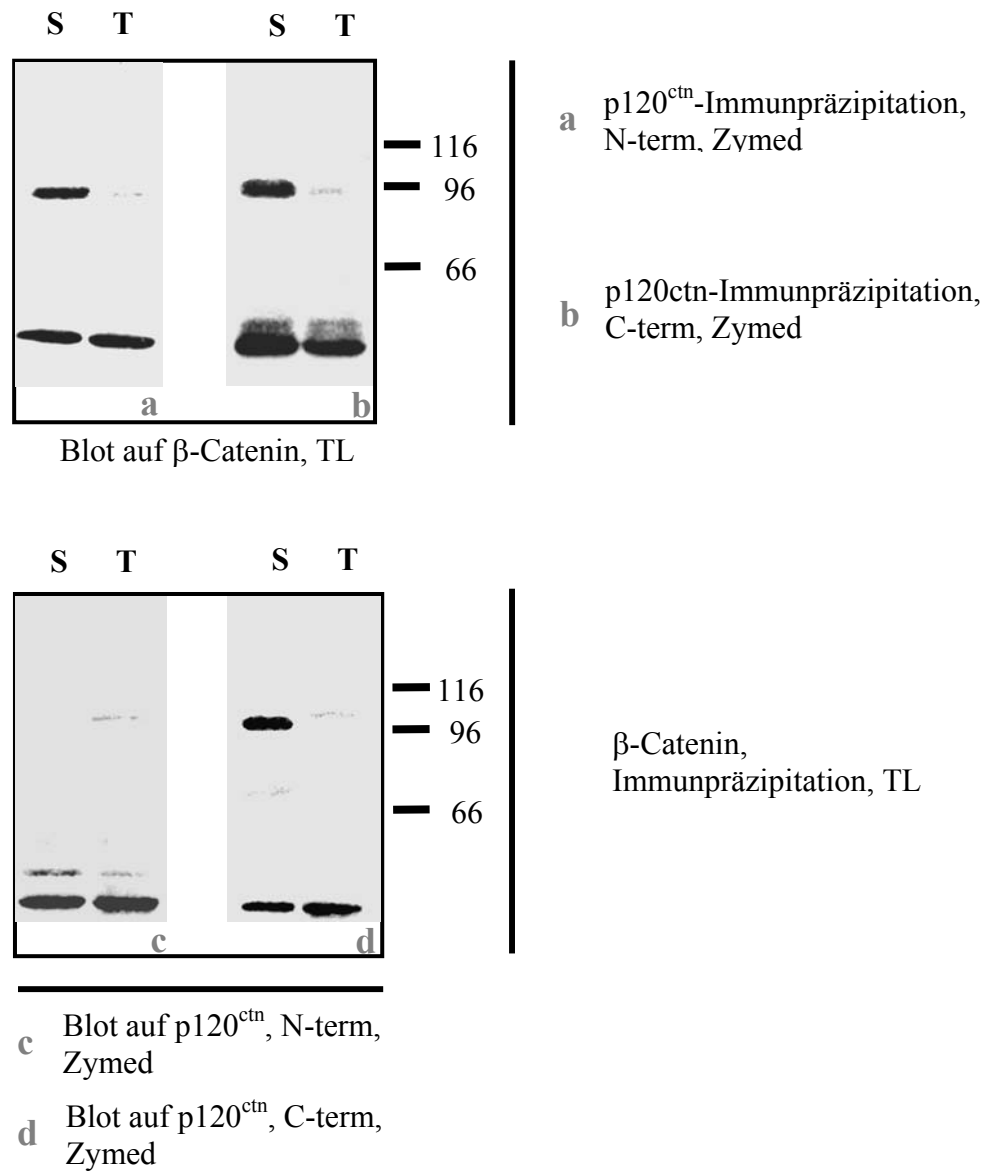
### **3.3.2 Assoziation der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen zum Cadherin/Catenin-Komplex**

In weiteren Experimenten untersuchten wir, welche Isoformen an der Bildung des Cadherin/Catenin-Komplexes vor allem in PaTu 8889S beteiligt sind. Dazu führten wir Immunpräzipitationsexperimente und Immunfluoreszenzfärbungen durch.

Um PaTu 8889S direkt mit PaTu 8889T vergleichen zu können, untersuchten wir in dieser Analyse  $\beta$ -Catenin als indirekten Bindungspartner der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen. Eine Kopräzipitation einer p120<sup>ctn</sup>-Isoform mit  $\beta$ -Catenin werteten wir als Assoziation von p120<sup>ctn</sup> an E-Cadherin. In den folgenden Experimenten führten wir Immunpräzipitationen sowohl mit anti- $\beta$ -Catenin als auch mit den N- und C-terminalen p120<sup>ctn</sup>-Antikörpern durch und analysierten diese im Western- Blot jeweils auf p120<sup>ctn</sup> und auf  $\beta$ -Catenin (Abb.12).

Die Western-Blots zeigten in der Zelllinie PaTu 8889S in der Immunpräzipitation von p120<sup>ctn</sup> sowohl durch den N-terminalen als auch durch den C-terminalen Antikörper eine Bindung an  $\beta$ -Catenin (Abb.12, a und b). Die reverse Immunpräzipitation zeigte mit dem C-terminalen Antikörper eine deutliche Bande bei ca. 96 kDa (Abb.12, c und d). Damit zeigte sich in PaTu 8889S eine Isoform der Gruppe 3 über  $\beta$ -Catenin an E-Cadherin gebunden. Die in der Immunpräzipitation mit dem N-terminalen

p120<sup>ctn</sup>-Antikörper sichtbare  $\beta$ -Catenin-Bande (Abb.12, a) implizierte außerdem die Bindung einer der Isoformen 1 oder 2.



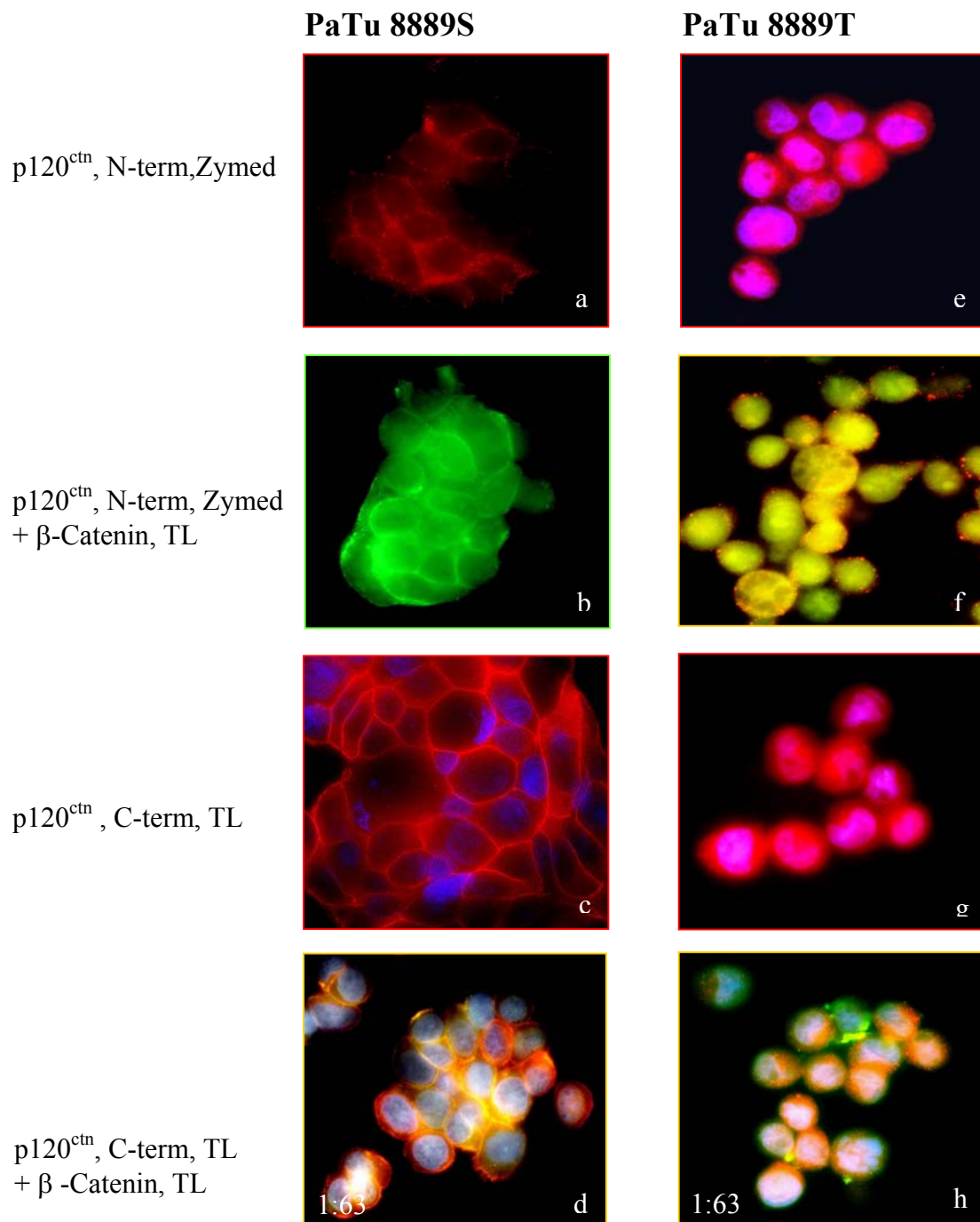
**Abb.12 Bindung der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen an  $\beta$ -Catenin in PaTu 8889S und PaTu 8889T**

In der Zelllinie PaTu 8889S werden in der Präzipitation von p120<sup>ctn</sup> sowohl durch den N-terminalen als auch durch den C-terminalen Antikörper Bindungen an  $\beta$ -Catenin erkennbar (a und b). Im reversen Experiment zeigt sich mit dem C-terminalen Antikörper eine deutliche Bande bei ca. 96 kDa (d). In der Zelllinie PaTu 8889 T zeigen sich schwächere Banden.

In der PaTu 8889T-Zelllinie zeigten sich in beiden Präzipitationsexperimenten sehr schwache Banden. Möglicherweise repräsentierten diese das Vorliegen geringer Level von E-Cadherin oder anderer Cadherine, so dass eine Bindung von p120<sup>ctn</sup> über  $\beta$ -Catenin zustande kommen konnte. In diesem Falle zeigten die Präzipitationsexperimente die Bindung der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen 1 oder 2 an E-Cadherin oder andere Cadherine (Abb.12, c und d). Außerdem kommen ein geringes Maß direkter Kopplung von p120<sup>ctn</sup> an  $\beta$ -Catenin oder unspezifische Kreuzreaktionen der Antikörper als Erklärungen in Frage.

Wie in Abbildung 13 dargestellt konnten diese Ergebnisse in Immunfluoreszenzfärbungen reproduziert werden. PaTu 8889S zeigte in der Färbung mit dem N-Terminalen p120<sup>ctn</sup>-Antikörper eine schwache Anfärbung der Zellmembran (Abb.13, a). In der Färbung mit dem C-Terminalen Antikörper zeigte sich eine deutliche Anfärbung der Zellmembran von PaTu 8889S, ein schwächeres Signal zeigte sich im Zytosol (Abb.13, c). Beide Färbungen waren identisch mit denen für  $\beta$ -Catenin (Abb.13, b und d). Diese Kollokalisierung bestätigte die vermutete Komplexbindung der Isoformen 1 oder 2 und der Isoform 3 mit E-Cadherin an der Zellmembran. Weitere p120<sup>ctn</sup>-Isoformen lagen im Zytosol von PaTu 8889S vor. In PaTu 8889T zeigten sowohl die Färbung mit dem N-Terminalen, als auch die mit dem C-Terminalen Antikörper gegen p120<sup>ctn</sup> eine diffuse Färbung des Zytosols (Abb.13, e und g), die mit der  $\beta$ -Catenin-Färbung kollokalisiert war (Abb.13, f und h). Eine direkte Bindung der beiden Proteine ist jedoch bisher nicht bekannt. Weder  $\beta$ -Catenin, noch p120<sup>ctn</sup> zeigten eine membranständige Lokalisation.





**Abb. 13 Lokalisation der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen und  $\beta$ -Catenin in PaTu 8889S und PaTu 8889T**

PaTu 8889S zeigt eine schwache membranständige Färbung der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen 1 und 2 (a), diese Färbung ist mit der  $\beta$ -Catenin-Färbung kolokalisiert (b). Weitere p120<sup>ctn</sup>-Isoformen zeigen sich überwiegend an der Zellmembran (c) und sind deutlich mit  $\beta$ -Catenin kolokalisiert (d).

In PaTu 8889T liegen sowohl die p120<sup>ctn</sup>-Isoformen der Gruppen 1 oder 2 (e), als auch die der Gruppen 1-4 (g) im Zytosol vor. Sie zeigen jeweils eine Kolokalisation mit der  $\beta$ -Catenin-Färbung (f und h).

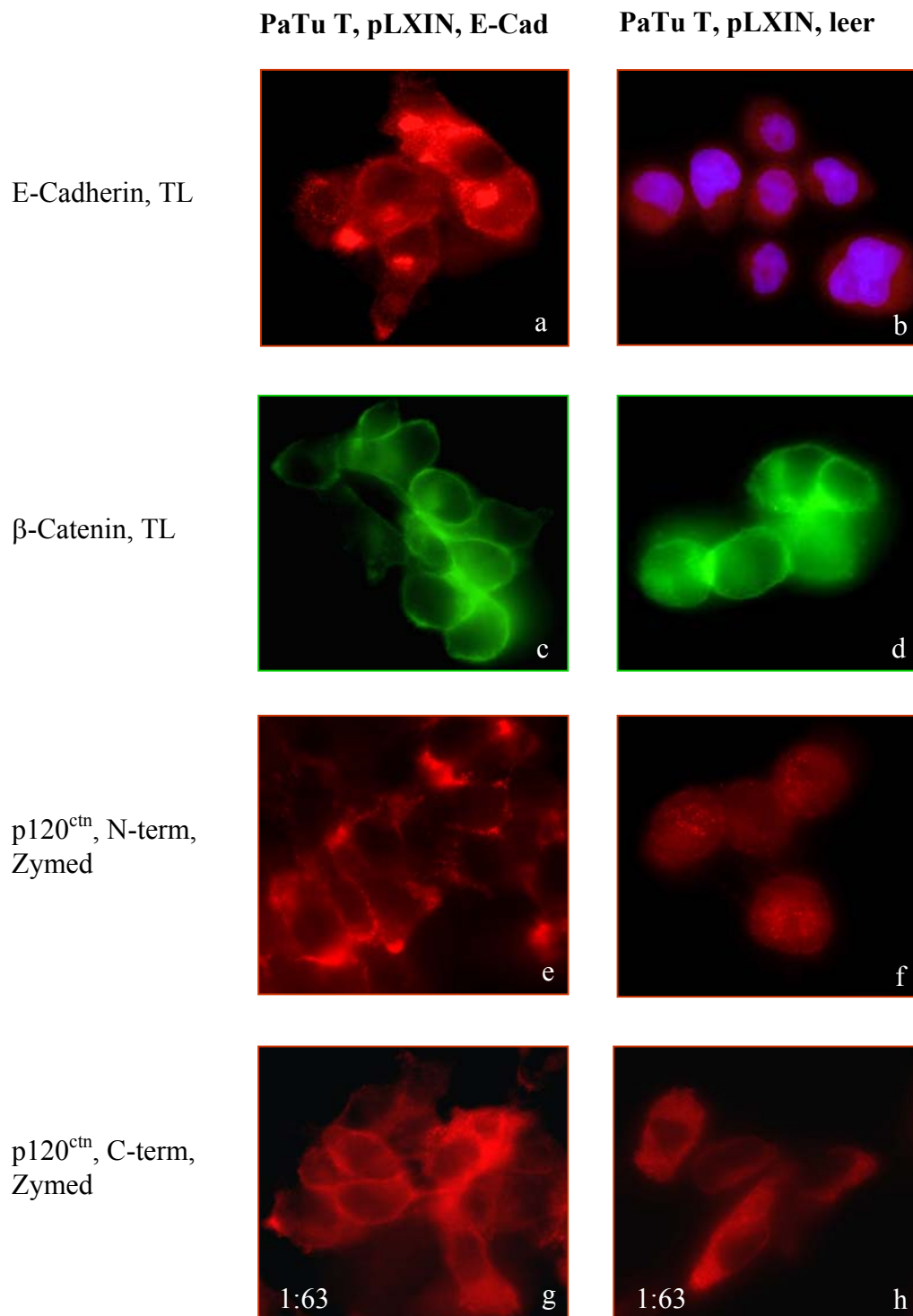
### **3.4 Funktion von E-Cadherin in Struktur und zellbiologischem Verhalten von Tumorzellen**

Die charakterisierten Zelllinien mit PaTu 8889T als E-Cadherin defizientes Zellmodell gaben uns nun die Möglichkeit, die Funktion von E-Cadherin und seiner Bindungspartner und deren Rolle bei der Proliferation und Migration von Tumorzelllinien weiter zu analysieren. Zu diesem Zweck bedienten wir uns der stabilen Infektion von PaTu 8889T mit einem in einen retroviralen pLXIN-Vektor klonierten full-length-E-Cadherin-Konstrukt. Die infizierten Zellen wurden mittels Neomycin selektiert, kloniert und auf E-Cadherin-Expression untersucht. An E-Cadherin exprimierenden Zellklonen wurden entsprechend der Wildtyp-Charakterisierung die zellbiologischen Assays wiederholt. Anschließend analysierten wir die Zellklone auf die Expression des Cadherin/Catenin-Komplexes.

#### **3.4.1 Charakterisierung des Cadherin/Catenin-Komplexes in der E-Cadherin-infizierten PaTu 8889T-Zelllinie**

Bereits bei einfacher lichtmikroskopischer Beobachtung der E-Cadherin-infizierten Zellklone wurde im Vergleich zum Wildtyp eine Veränderung der Zellmorphologie sichtbar. Die infizierten Zellen bildeten nun Zell-Zellkontakte aus. Die geringe Substratanhaftung wurde zugunsten einer engen Verbindung der Zellen zueinander aufgegeben. Die Zellgrenzen waren zu Beginn eines im Vergleich zum Wildtyp leicht verlängerten Passagezeitraums gut zu diskriminieren, verloren sich aber bei zunehmender Konfluenz.

Kontrollen der Einzelzellklone im Western Blot zeigten eine deutliche Expression von E-Cadherin in den infizierten Zelllinien im Vergleich zu den Leervektor-infizierten Kontrollen. Die Immunfluoreszenzexperimente (Abb.14) zeigten in den infizierten Zellklonen ein deutliches E-Cadherin-Signal im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb.14, a und b). Die Färbung in E-Cadherin-positiven Zellklonen war sowohl an der Zellmembran, als auch in Aggregaten im Zytoplasma lokalisiert. Bei diesen Aggregaten könnte es sich um das ER handeln, in dem aufgrund der Überexpression freies E-Cadherin kumuliert.

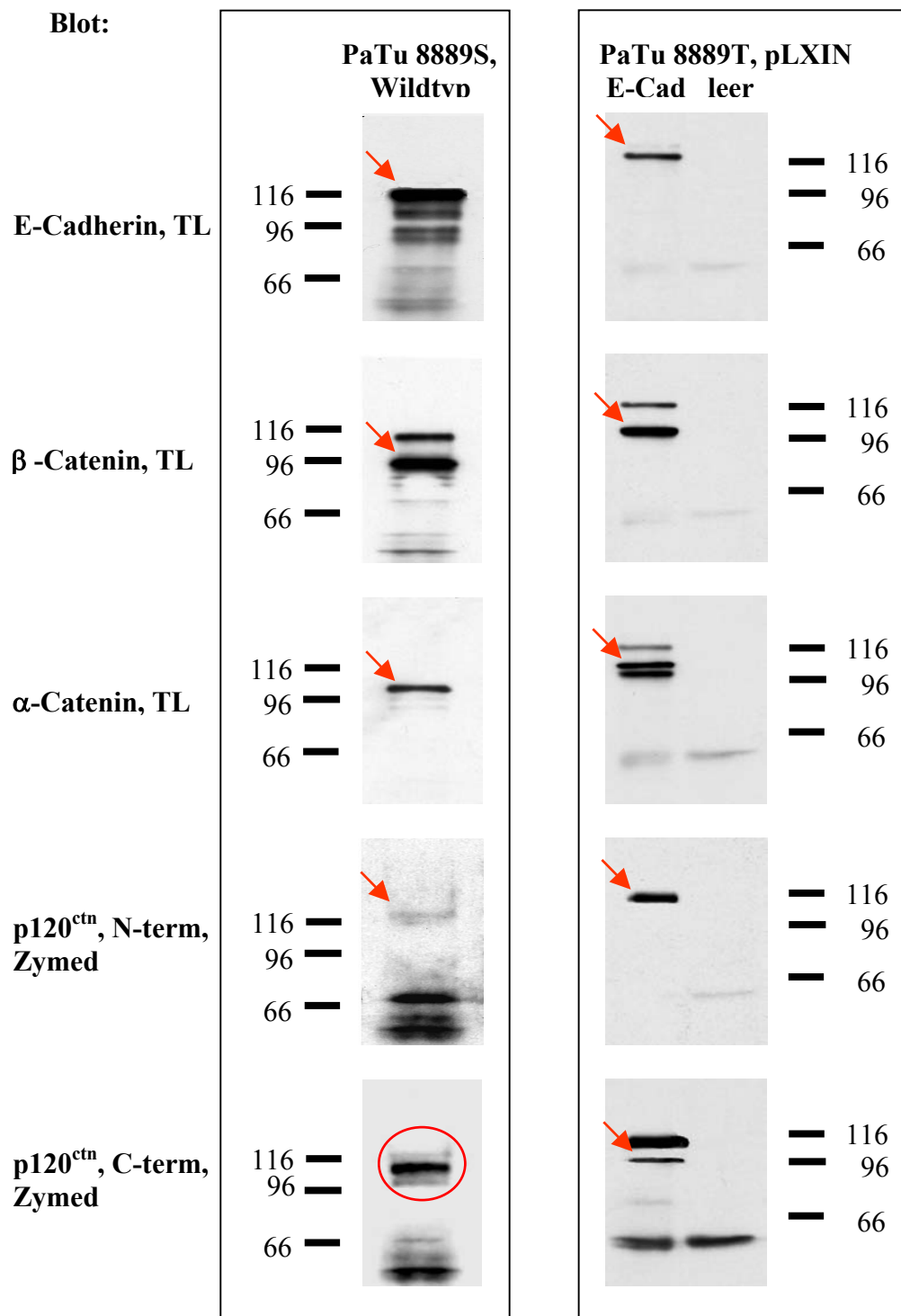


In einem nächsten Schritt untersuchten wir als bekannte E-Cadherin-Bindungspartner  $\beta$ -Catenin und p120<sup>ctn</sup> durch immunhistochemische Färbung (Abb.14, e-h). Bei der Untersuchung von  $\beta$ -Catenin zeigte sich ein deutliches Signal an der Zellmembran, welches in seiner Intensität das des Leervektor-Klons überstieg (Abb.14, c und d). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass  $\beta$ -Catenin in den E-Cadherin-exprimierenden Zellklonen an der Zellmembran an E-Cadherin gebunden wird und somit am Aufbau eines Cadherin/Catenin-Komplexes beteiligt ist.

Die Detektion von p120<sup>ctn</sup> erfolgte mit den schon beschriebenen Antikörpern der Firma Zymed. In den E-Cadherin-infizierten Zellklonen zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp eine Umverteilung des p120<sup>ctn</sup>-Signals an die Zellmembran: Der N-Terminale Antikörper zeigte eine Bindung der Isoformen 1 und/oder 2 an die Zellmembran (Abb.14,e), die Färbung des C-Terminale Antikörpers detektierte sowohl ein stärkeres membranständiges als auch ein zytosolisches Signal (Abb 14, g). Die Negativkontrolle dagegen wies die vom Wildtyp bekannte zytosolische Lokalisation aller p120<sup>ctn</sup>-Isoformen auf (Abb.14, f und h).

In den folgenden Immunpräzipitationsexperimenten (Abb.15) analysierten wir den Zusammenhalt des Komplexes, sowie die Bindung spezifischer p120<sup>ctn</sup>-Isoformen an den Komplex in den E-Cadherin-infizierten Zellklonen im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle. Vergleichend führten wir die Experimente auch mit dem PaTu 8889S-Wildtyp durch. Dabei präzipitierten wir aus Triton-Totallysaten mit dem monoklonalen E-Cadherin-Antikörper von TL E-Cadherin und detektierten im Western Blot mit den bekannten Antikörpern  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin sowie p120<sup>ctn</sup> mit der bereits etablierten Isoform-Differenzierung.

Wie in PaTu 8889S zeigte sich in der E-Cadherin infizierten Zelllinie von PaTu 8889T eine deutliche Expression von E-Cadherin. In Western-Blots zur Detektion von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin zeigten sich die Bestandteile ausreichend exprimiert und an den Komplex mit E-Cadherin gebunden. In den Leervektor-infizierten Kontrollen konnte dagegen kein E-Cadherin präzipitiert werden.



**Abb. 15 E-Cadherin-Immunopräzipitation in PaTu 8889S und PaTu 8889T, infiziert mit pLXIN E-Cadherin und leerem Vektor**

Die mit E-Cadherin infizierte Zelllinie von PaTu 8889T zeigt wie PaTu 8889S eine deutliche Expression von E-Cadherin. In beiden Zelllinien werden  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin sowie die p120<sup>ctn</sup>-Isoformen der Klassen 1 oder 2 und 3 an E-Cadherin gebunden. Die mit dem leeren Vektor infizierte Zelllinie zeigt keine Präzipitation von E-Cadherin.

Der Western-Blot zur Analyse der verschiedenen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen zeigte eine Bindung spezifischer Isoformen an E-Cadherin: Im Blot mit dem N-terminal ansetzenden Antikörper zeigte sich die schon aus dem Wildtyp bekannte Isoform 1 oder 2, im Blot mit dem C-terminalen Antikörper die Isoform 3, beide wurden nun aber anstelle ihrer Verteilung im Zytosol in der E-Cadherin infizierten Zelllinie an E-Cadherin gebunden. An der Zellmembran gebunden nahmen sie am Aufbau eines funktionellen Cadherin/Catenin-Komplexes teil. Eine Expression weiterer p120<sup>ctn</sup>-Isoformen in der infizierten Zelllinie im Vergleich zum Wildtyp im Sinne einer Induktion durch E-Cadherin konnte nicht gezeigt werden.

PaTu 8889S zeigte den bereits bekannten intakten Cadherin/Catenin-Komplex mit allen seine Bestandteilen. Wie schon in den Immunpräzipitationsexperimenten mit  $\beta$ -Catenin gezeigt, wurden Isoformen der Typen 1 oder 2 bzw. 3 als an E-Cadherin gekoppelt an der Zellmembran identifiziert. Auch hier schienen wieder unterschiedliche Splice-Varianten bzw. modifizierte Formen der einzelnen Isoformen vorzuliegen.

### **3.4.2 Einfluss der Expression von E-Cadherin auf das zellbiologische Verhalten von PaTu 8889T**

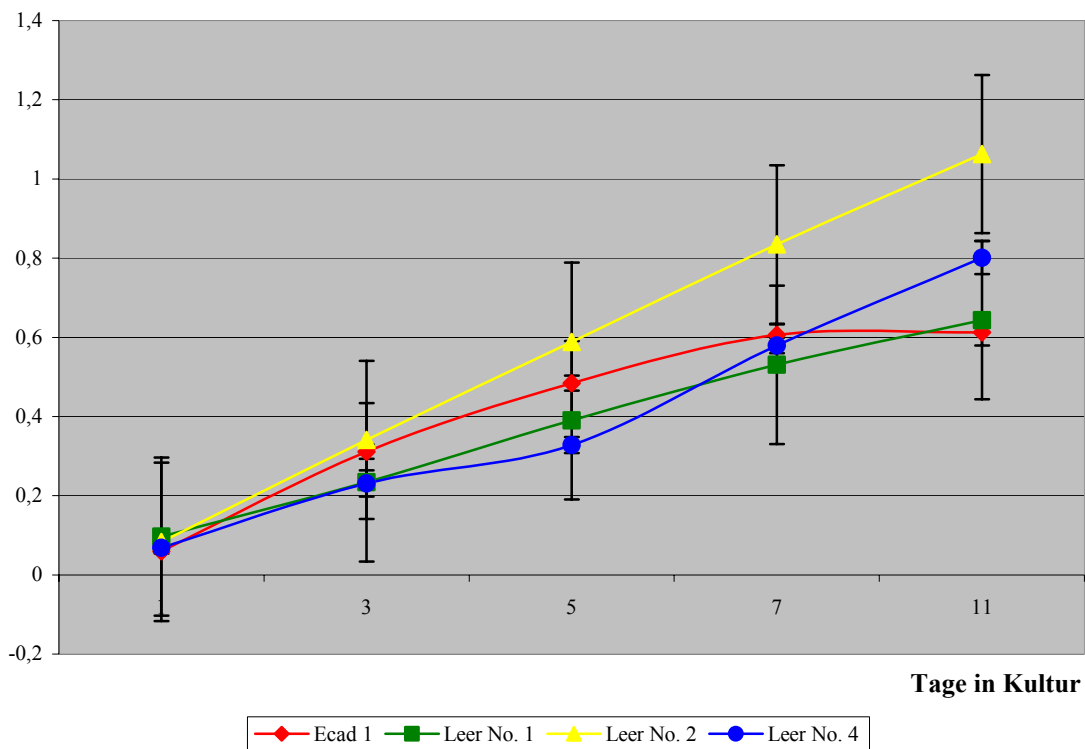
Zur weiteren Untersuchung der zellbiologischen Effekte der E-Cadherin-Infektion auf die Tumorzellen wurden die schon bekannten Zellkulturassays durchgeführt. Bei der Wertung der Ergebnisse der durchgeführten Zellkultur-Assays muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass die genannten Assays nur mit einem Klon von PaTu 8889T-E-Cadherin durchgeführt werden konnten. Im Vergleich hierzu konnten mehrere Leer-Vektor-Klone getestet werden, die zum Teil ein deutlich voneinander abweichendes zellbiologisches Verhalten zeigten.

#### **3.4.2.1 Funktion von E-Cadherin bei der Proliferation von Tumorzelllinien**

Um den Einfluss der Infektion von E-Cadherin auf die Proliferationsgeschwindigkeit zu untersuchen, führten wir erneut einen MTT-Wachstumsassay durch. Hierbei untersuchten wir das Verhalten der E-Cadherin-infizierten Zelllinie im Vergleich zu drei verschiedenen Leervektor-Kontrollen (Abb.16).

Im Vergleich zu den verwendeten Leer-Vektor-infizierten Kontrollen zeigten die E-Cadherin infizierten Zellen zunächst keinen nennenswerten Unterschied in der Proliferationsrate während der ersten 5 Tage der Inkubation. Ab dem 5. Tag jedoch

stagnierte die Proliferationsrate des E-Cadherin infizierten Klons zunehmend und erreicht am 7. Tag ein Plateau, während die Kontrollzellen weiterhin mit nahezu unveränderter Rate proliferierten. Die Kontrollklone unterschieden sich dabei untereinander deutlich in ihrer Stoffwechselaktivität und zeigten eine weite Streuung der Werte. Der Trend im unterschiedlichen Wachstumsverhalten im Vergleich zur E-Cadherin-infizierten Zellen wurde jedoch deutlich.

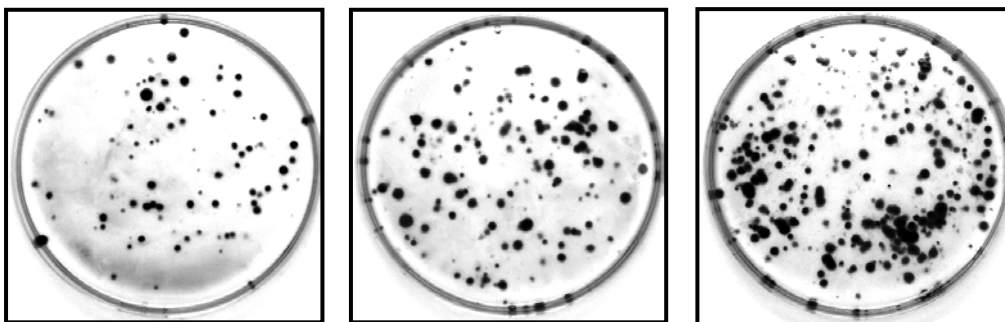


**Abb.16 MTT-Wachstumsassay in PaTu 8889T infiziert mit E-Cadherin und leeren Vektoren**  
Die E-Cadherin infizierten Zellen zeigen im Vergleich zu den Kontrollen während der ersten fünf Tage der Inkubation keinen Unterschied in der Proliferationsrate. Ab dem fünften Tag stagniert die Proliferationsrate des E-Cadherin infizierten Klons zunehmend und erreicht am siebten Tag ein Plateau, während die Kontrollzellen weiterhin mit nahezu unveränderter Rate proliferieren. Die mit dem leeren Vektor infizierten Zellen zeigen dabei eine weite Streuung.

### 3.4.2.2 Funktion von E-Cadherin bei der Koloniebildung von Tumorzelllinien

Um den möglichen Einfluss von E-Cadherin auf das Wachstumsverhalten von einzelnen Tumorzellen ohne den Kontakt zum Zellverband zu analysieren, führten wir mit den Zellklonen den oben beschriebenen Limited-Dilution-Assay durch (Abb.17). Auch in dieser Untersuchung wurde ein Einfluss der E-Cadherin-Infektion auf die Tumorzellen deutlich: Waren die Leervektor-infizierten Zellklone nach 14 Tagen Inkubationszeit bei regelmäßigem Mediumwechsel in der Lage, bei Zellzahlen von einer Ausgangsdichte von 250, 500 und 1000 Zellen pro 10-cm-Zellkulturschale gut anfärbbare Kolonien zu bilden, zeigten die E-Cadherin-Klone ebenfalls starke Koloniebildung. Die färbbaren Kolonien waren allerdings wesentlich kleiner als die der Negativkontrollen und die des Wildtyps von PaTu 8889T und damit sehr viel zahlreicher pro Platte vorhanden.

#### PaTu 8889T, Wildtyp

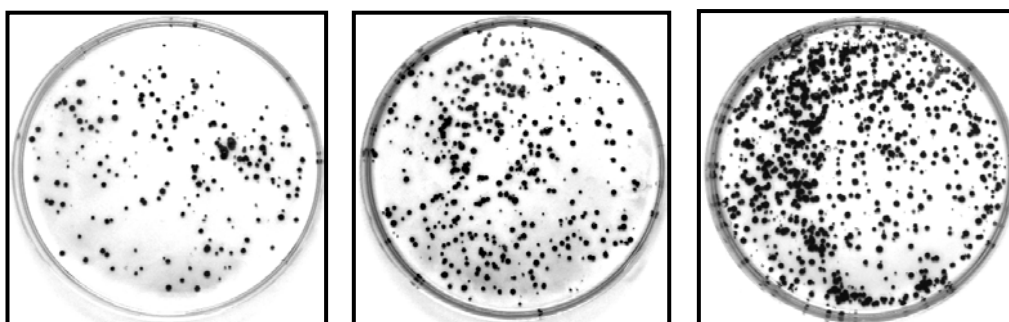


250 Zellen/Schale/14d

500 Zellen/Schale/14d

1000 Zellen/Schale/14d

#### PaTu 8889T, E-Cad transf



250 Zellen/Schale/14d

500 Zellen/Schale/14d

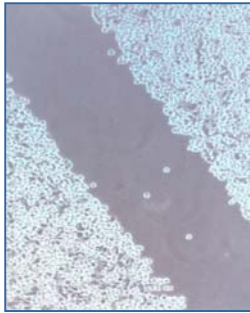
1000 Zellen/Schale/14d

**Abb. 17 Limited-Dilution-Assay in PaTu 8889T, infiziert mit E-Cadherin und leerem Vektor**  
Die mit dem leeren Vektor infizierten Klone zeigen eine dem Wildtyp von PaTu 8889T entsprechende Koloniebildung. Auch der mit E-Cadherin infizierte Klon zeigt starke Koloniebildung. Die färbbaren Kolonien stellen sich wesentlich kleiner dar als die der Negativkontrollen und sind damit sehr viel zahlreicher pro Platte vorhanden.

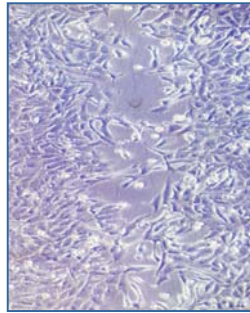


### 3.4.2.3 Funktion von E-Cadherin bei der Migration von Tumorzelllinien

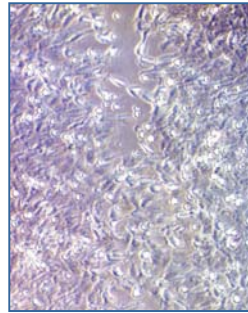
Um die Rolle von E-Cadherin auf die Migrationsfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wiederholten wir den oben beschriebenen In-Vitro-Wounding-Assay unter gleichen Bedingungen mit den E-Cadherin- und Leervektor infizierten Zellklonen (Abb.18). Während die Leervektor-infizierten Zellklone das für den Wildtyp typische Migrationsverhalten zeigten und innerhalb der ersten 24 h in der Lage waren, den freien Raum auf der Zellkulturschale zu besiedeln, zeigten die E-Cadherin-infizierten Zellklone ein davon abweichendes Verhalten: Schon nach ca. 4 h wurde am Rand des „scratches“ auf der Zellkulturschale eine gleichmäßige epithelartige Reihe von Zellen sichtbar, die sich aus dem bestehenden Zellverband vorzuschieben schienen. Diese Reihe gestaltete sich eben und bestand nur aus einer einzigen Zellschicht. Im Vergleich zu dem scheinbar „ungeordneten“ Einwandern der Leervektor-infizierten Zellklone setzten die E-Cadherin-Klone im Verlauf des Experimentes ihr gezeigtes Wanderungsverhalten fort. Sich übereinander vorschiebend besiedelten sie den freien Raum Reihe um Reihe, ohne als einzelne Zellen den Verband zu verlassen. Dabei wuchsen sie streng als Monolayer. Ebenso wie die Vergleichszellklone waren sie in der Lage, die Kontinuität des Zellverbandes binnen 24-48 h wieder vollständig herzustellen.

**PaTu 8889T, leerer Vektor**

0h



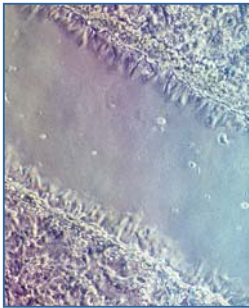
6h



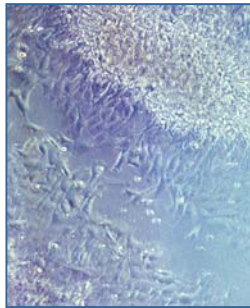
12h



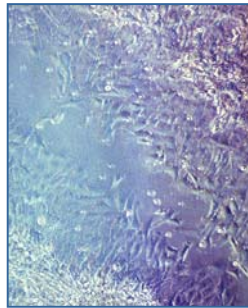
24h

**PaTu 8889T, E-Cad inf.**

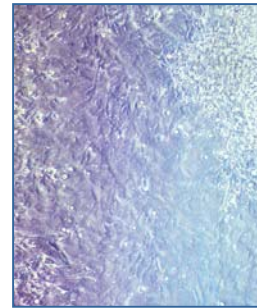
2h



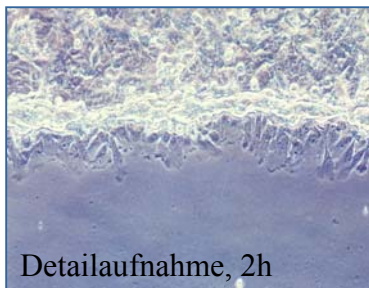
6h



12h



24h



Detailaufnahme, 2h

**Abb.18 In-Vitro-Wounding-Assay in PaTu 8889T, infiziert mit E-Cadherin und leerem Vektor**

Die Leervektor-infizierten Zellklone zeigen ein dem Wildtyp entsprechendes Migrationsverhalten. Der mit E-Cadherin infizierte Zellklon migriert mit deutlicher Bindung an den Zellverband in langsamerer Geschwindigkeit. Eine Lösung einzelner Zellen aus dem Zellverband ist nicht mehr möglich.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1 Die Rolle von E-Cadherin bei der Proliferation und Migration von humanen Pankreas-Adenokarzinomzelllinien**

#### **4.1.1 E-Cadherin führt durch die Formation von Zell-Zellkontakten zu einer Reduktion autonomen Wachstums in PaTu 8889T**

Die Schwester-Tumorzelllinien PaTu 8889S und PaTu 8889T erwiesen sich als ein sehr gut geeignetes Modell, um Wachstums- und Proliferationseigenschaften sowie die Transformationsmechanismen von malignen Tumorzelllinien zu untersuchen. Bereits bei der Kultivierung und lichtmikroskopischen Beobachtung fiel der deutliche Unterschied in Morphologie und Passagierzeiten der Schwesterzelllinien auf. Einen Hinweis auf die Genese dieser Unterschiede konnten wir mit der Analyse des Cadherin/Catenin-Komplexes geben.

Das Fehlen von E-Cadherin in der Zelllinie PaTu 8889T hat vermutlich großen Einfluss auf die Morphologie, die Proliferationsgeschwindigkeit und die Migrationseigenschaften der Tumorzellen. Die Überexpression von E-Cadherin in der Zelllinie PaTu 8889T und der Vergleich der Zelllinien in den verwendeten Zellkulturassays macht einige Funktionen von E-Cadherin deutlich.

E-Cadherin ist der entscheidende Bestandteil von epithelialen Zell-Zellkontakten: Nach der Expression von E-Cadherin in PaTu 8889T binden die intrazellulär vorhandenen Catenine und formieren einen vermutlich intakten Cadherin/Catenin-Komplex an der Zellmembran von PaTu 8889T. Dieser geht mit einer Veränderung der Morphologie der Zellen einher: Das spindelförmige Aussehen der Zellen verändert sich zugunsten einer eher rundlichen Struktur, Ausläufer bilden sich zurück und die Zellen bilden Kontakte zu ihren Nachbarzellen aus. In den Zellkulturassays zeigen sich deutliche Veränderungen im Wachstumsverhalten der E-Cadherin enthaltenden Zelllinie im Vergleich zu den Kontrollen und den Wildtypzellen: Im Proliferationsassay zeigt sich nach dem Einbringen eines funktionierenden Cadherin/Catenin-Komplexes eine Stagnation der Proliferation etwa bei Erreichen der Zellkonfluenz nach 5-7 Tagen Kultivierung. Dieses Verhalten ähnelt der E-Cadherin enthaltenden Zelllinie PaTu 8889S.

Der Vergleich der Wildtypzellen im Limited-Dilution-Assay lässt vermuten, dass im Zellverband wachsende Zellen den Kontakt zu Nachbarzellen und zum Untergrund benötigen, um zu proliferieren. Diese Eigenschaft zeigt sich besonders in den Ergebnissen des Migrationsassays: Nach der Expression von E-Cadherin in PaTu 8889T zeigt sich eine deutliche Verminderung der Wanderungsfähigkeit der PaTu 8889T-Zellen. Die Einzelzellen sind nicht mehr in der Lage, ihren Gewebsverband zu verlassen, lediglich ein gemeinsames Vorschieben des Zellverbands bleibt möglich. Auch hier ähnelt die E-Cadherin-infizierte Zelllinie von PaTu 8889T dem Verhalten der PaTu 8889S-Wildtypzellen.

E-Cadherin vermittelt also einige wichtige Mechanismen in den untersuchten PaTu-Zelllinien: Zellhaftung verbunden mit der Formation von kohärenten Zellverbänden, Kontaktinhibition und die Verhinderung von Zellmigration.

#### **4.1.2 E-Cadherin inhibiert Signaltransduktionswege durch die Bindung von Cateninen**

Die an der intrazellulären Domäne von E-Cadherin bindenden Catenine haben ebenfalls vielfältige Einflüsse auf die Stabilität der Zell-Zellkontakte und auf die Vermittlung von Wachstums- und Proliferationssignalen.<sup>3,9,14,20,36,61,82</sup> So führte zum Beispiel die Überexpression von VE-Cadherin in CHO-Zellen zur Vermittlung von Zell-Zellkontakten und zu einer Inhibition des Zellkulturwachstums. Die Expression eines VE-Cadherin-Konstruktes, dem die intrazelluläre Bindungsdomäne der Catenine fehlte, beeinflusste in keiner Weise die Bildung von Zelladhäsion, eine Inhibition des Zellwachstums konnte jedoch nicht mehr nachgewiesen werden.<sup>16</sup> Wie viele andere Versuche legt auch dieser nahe, dass die Ursachen der in unseren Analysen beobachteten Veränderungen im Wachstums- und Migrationsverhalten der PaTu-Zelllinien nicht nur durch die Bildung von Zell-Zellkontakten an der Zelloberfläche, sondern auch auf intrazellulärer Ebene zu suchen sind.

Die Familie der Catenine stellt eine heterogene Gruppe dar. Ihnen gemein ist die Bindung an E-Cadherin an Zell-Zellkontakten. Verschiedene Versuche konnten zeigen, dass die Catenin-Bindung für die Ausbildung von Adherens Junctions notwendig ist. So vermuteten Chitaev und Trojanowski, dass ohne die Bindung der Catenine an E-Cadherin zwar ein laterales „Clustering“ zwischen benachbarten

E-Cadherin-Molekülen, nicht aber die Formation von festen Bindungen an Adherens Junctions möglich sei.<sup>83</sup>

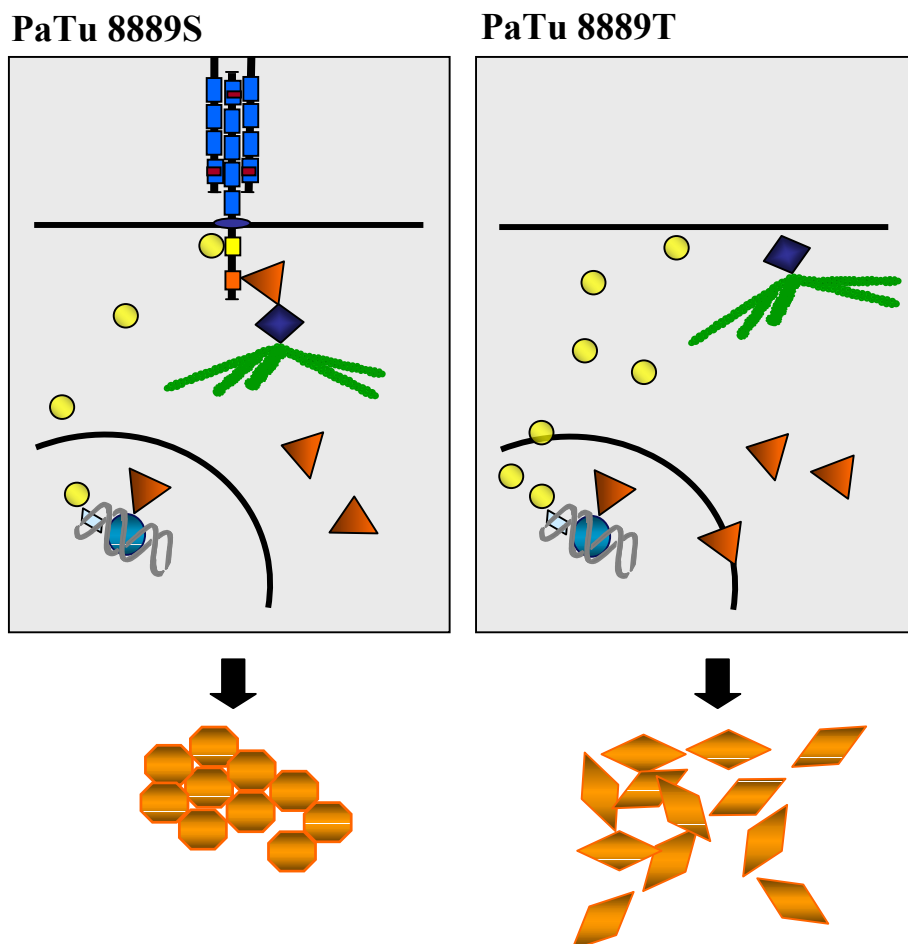
So spielt vor allem  $\alpha$ -Catenin als Bindungsglied zwischen der Zellmembran und dem Zytoskelett eine Rolle und trägt entscheidend zur Stabilität des Komplexes bei.<sup>42,60</sup> Andere Catenine wie  $\beta$ -Catenin und p120<sup>ctn</sup> jedoch fanden sich nicht nur an der Zellmembran, sondern konnten auch im Zytosol und Zellkern nachgewiesen werden. Abhängig von ihrer Lokalisation und Konzentration werden ihnen unterschiedliche Funktionen in der Zelle zugeschrieben. An den Komplex gebunden tragen sie zur Zelladhäsion bei<sup>2,20,38,60,83</sup>, im Zytosol zeigen sowohl  $\beta$ -Catenin als auch p120<sup>ctn</sup> jedoch andere Eigenschaften.  $\beta$ -Catenin ist über das wnt-Signal und die Bindung an LCF/TCF<sup>18,33,57</sup>, p120<sup>ctn</sup> über KAISO an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt.<sup>19</sup> Sowohl  $\beta$ -Catenin als auch p120<sup>ctn</sup> wirken also an der Zellmembran durch den Aufbau von Zell-Zellkontakten vermutlich invasiven Zelleigenschaften entgegen, eine Umverteilung in Zytosol und Zellkern jedoch könnte bestimmte Wachstumsvorgänge aktivieren.

Während in PaTu 8889S  $\beta$ -Catenin und ein Teil der vorhandenen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen an E-Cadherin gebunden werden, liegen  $\beta$ -Catenin und p120<sup>ctn</sup> in PaTu 8889T im Zytosol vor. Dieses relative Übergewicht von  $\beta$ -Catenin und p120<sup>ctn</sup> im Zytosol von PaTu 8889T könnte über die vermehrte Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen für die im Vergleich beobachteten autonomeren Wachstumseigenschaften mitverantwortlich sein. Unsere Experimente konnten zeigen, dass die Expression von E-Cadherin in PaTu 8889T zu einer Bindung von  $\beta$ -Catenin und einem Teil des p120<sup>ctn</sup> führt. Diese relative Verminderung der Konzentration von  $\beta$ -Catenin und p120<sup>ctn</sup> im Zytosol könnte somit zum Beispiel zur beobachteten Reduktion der Zell-Proliferation im MTT-Assay beitragen.

#### **4.1.3 Der Verlust von E-Cadherin begünstigt die Tumorentstehung**

Aus den dargestellten Beziehungen und den in den Zelllinien beobachteten Veränderungen durch die Expression von E-Cadherin in PaTu 8889T lässt sich ein Modell entwerfen, welches beispielhaft einen Mechanismus der Tumorentstehung in PaTu 8889S und PaTu 8889T veranschaulichen soll (Abb. 19): Der Verlust von

E-Cadherin in der Zelllinie PaTu 8889T führt an der Zelloberfläche zu einem Verlust an Zelladhäsion. Einzelne Zellen sind nun in der Lage, sich aus dem Zellverband zu lösen. Diese Eigenschaft ist grundlegend für Metastasierungsprozesse in malignen Tumorzellverbänden. Gleichzeitig verliert die E-Cadherin-defiziente Zelle an der Innenseite der Zellmembran die Fähigkeit, Catenine an sich zu binden. Zum einen führt dies zu einem weiteren Verlust der Gewebestabilität, zum anderen führen die sich im Zytosol ansammelnden Catenine, und hier insbesondere  $\beta$ -Catenin und  $p120^{ctn}$ , zu einer Stimulation des proliferativen Zellwachstums. Rasches und invasives Tumorstadium werden somit ermöglicht (Abb. 19).



**Abb.19 Funktion der Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes in PaTu 8889S und PaTu 8889T**  
 Der Verlust von E-Cadherin in PaTu 8889T führt zu einer veränderten Verteilung der Catenine in Zytosol und Zellkern. Vor allem die Translokation von  $\beta$ -Catenin und  $p120^{ctn}$ -in das Zytosol und den Zellkern von PaTu 8889T führt zu Veränderungen im Wachstumsverhalten der Zelllinie.

Die Zelle verliert durch die fehlenden Informationen von der Zelloberfläche die Fähigkeit, den essentiellen Mechanismus der Kontaktinhibition zu vermitteln. Der Verlust dieser physiologischen Funktion stellt einen wichtigen Faktor im Übergang von gesundem Gewebe in maligne Tumoren dar. Bereits in mehreren Untersuchungen konnte das Fehlen von E-Cadherin mit der Entwicklung von malignen Tumoren in Verbindung gebracht werden. E-Cadherin defiziente Tumoren zeigten außerdem eine Tendenz zu häufigerer Metastasenbildung und waren mit einer schlechteren Prognose verbunden.

## **4.2 Die Rolle von p120<sup>ctn</sup> bei der Proliferation und Migration von humanen Pankreas-Adenokarzinomzelllinien**

Bei der Betrachtung des Cadherin/Catenin-Komplexes in den beiden PaTu-Zelllinien fielen neben der unterschiedlichen Expression von E-Cadherin und den damit verbundenen Unterschieden in der Verteilung der Catenine vor allem Unterschiede in der Expression von p120<sup>ctn</sup> auf. Die Rolle der unterschiedlichen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen ist bislang nicht hinreichend geklärt, einzelnen Isoformen konnten aber in letzter Zeit spezifische Funktionen zugeschrieben werden. Zum einen konnten Einflüsse spezifischer Isoformen auf die Funktionalität des Cadherin/Catenin-Komplexes gefunden werden, zum anderen führten Überexpressions- oder Knock-out-Modelle zu der Vermutung, dass spezifische Isoformen mit bestimmten Wachstumseigenschaften der Zellen in Verbindung stehen.

### **4.2.1 Die große Variationsbreite der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen in PaTu 8889S bietet vielfältige Regulationsmöglichkeiten**

Bereits zu Beginn der Analyse der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen fiel auf, dass PaTu 8889S im Gegensatz zu PaTu 8889T vor allem bei den kurzen Isoformen der Klassen 3 und 4 viele unterschiedliche Isoformen der gleichen Klasse exprimiert, während in PaTu 8889T nur zwei Isoformen unterschiedlicher Klassen vorkommen. Eine Erklärungsmöglichkeit für die große Variationsbreite der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen in PaTu 8889S könnte in der Expression unterschiedlicher C-terminaler Exons (A, B, AB, C) liegen. Den Splice-Varianten am C-Term des Proteins kommen spezifische Funktionen zu: Versuche konnten zum Beispiel zeigen, dass das am C-Terminus lokalisierte Exon B ein nukleäres Export-Signal enthält, welches die Ausschleusung der betreffenden p120<sup>ctn</sup>-Isoform aus dem Zellkern bewirkt.<sup>79</sup> Die selektive Expression

Exon-B-enthaltender p120<sup>ctn</sup>-Isoformen in PaTu 8889S gäbe der Zelllinie einen Regulationsmechanismus für die p120<sup>ctn</sup>-vermittelte Wachstums- und Migrationsinduktion im Zellkern.

Zum anderen könnten die multiplen p120<sup>ctn</sup>-Unterformen in PaTu 8889S die Folge posttranslationaler Modifikationen wie zum Beispiel durch Phosphorylierung oder Glykosylierung darstellen. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die Aktivität von E-Cadherin-gebundenem p120<sup>ctn</sup> durch Phosphorylierung regulieren lässt.<sup>64,78</sup> Phosphoryliertes p120<sup>ctn</sup> verliert dabei seine E-Cadherin stabilisierenden Eigenschaften.<sup>38,58</sup> Da PaTu 8889S E-Cadherin-vermittelte Junctions unter Bindung bestimmter p120<sup>ctn</sup>-Isoformen aufbaut, könnte in der Phosphorylierung ein weiterer regulatorischer Mechanismus der Zelladhäsion in PaTu 8889S liegen.

Auch wenn wir in unseren Experimenten die Genese der multiplen p120<sup>ctn</sup>-Unterformen in PaTu 8889S nicht klären konnten, könnte doch die Reduktion dieser Proteinvarianten in PaTu 8889T mit dem Verlust posttranslationaler Kontrolle oder der Downregulation Exon-B-tragender p120<sup>ctn</sup>-Isoformen einhergehen. Das Fehlen dieser Kontrollmechanismen könnte in PaTu 8889T zu einer Aktivierung autonomer Wachstums- und Migrationseigenschaften beigetragen haben.

#### **4.2.2 Die p120<sup>ctn</sup>-Isoform 3 stabilisiert in den PaTu-Zelllinien E-Cadherin an Zell-Zellkontakten**

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass in der Zelllinie PaTu 8889S vor allem eine kurze p120<sup>ctn</sup>-Isoform der Klasse 3 an den Cadherin/Catenin-Komplex bindet. Die spezifische Bindung der gleichen Isoformklasse an exogen transfiziertes und überexprimiertes E-Cadherin in PaTu 8889T-Zellen legt nahe, dass die p120<sup>ctn</sup>-Isoform 3 in den PaTu-Zellen spezifisch mit dem Cadherin/Catenin-Komplex assoziiert ist. Einige Arbeitsgruppen unterteilten die vielfältigen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen ihrer Größe nach in „lange“ (1 und 2) und „kurze“ (3 und 4) Isoformen. Diese Einteilung spiegelt aber auch funktionelle Eigenschaften wider. Vor allem für die kurzen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen konnte eine starke Stabilisierung E-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Kontakte gezeigt werden.<sup>38</sup> Experimente von Montonen et al. zeigten ebenfalls in verschiedenen Geweben von Mäusen die Bindung einer kurzen, der menschlichen Isoform 3 entsprechenden Form von p120<sup>ctn</sup> an epitheliale Zell-Zellkontakte<sup>53</sup>, ebenso identifizierte die Gruppe um Aho et al. in gesunden und malignen epithelialen Zellen



vor allem die Isoform 3A als an Zell-Zellkontakten lokalisiert.<sup>2</sup> Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch in den untersuchten PaTu-Zelllinien vor allem der p120<sup>ctn</sup>-Isoform 3 im Sinne eines E-Cadherin-„rescue“<sup>2,20,58,82</sup> eine stabilisierende Rolle der Zell-Zellkontakte an Adherens Junctions zukommt. Die Stabilisierung des Komplexes in PaTu 8889S und in der E-Cadherin exprimierenden Zelllinie von PaTu 8889T unterstützt somit die durch E-Cadherin vermittelten Wachstumseigenschaften im Sinne einer festen Bindung an den Zellverband, die damit verbundene Verhinderung schneller Migration und die Vermittlung der Kontaktinhibition. Unsere Experimente zeigten außerdem auch die Bindung einer langen Isoform an den Cadherin/Catenin-Komplex sowohl in den Wildtyp-Zellen von PaTu 8889S als auch in den E-Cadherin überexprimierenden Zellklonen von PaTu 8889T. Entsprechend der Isoform 3 könnte somit auch dieser Isoform eine solche E-Cadherin stabilisierende Rolle zukommen.

#### **4.2.3 Eine lange p120<sup>ctn</sup>-Isoform beeinflusst die Migrationseigenschaften der PaTu-Zelllinien**

Sowohl in Zellen von PaTu 8889S als auch von PaTu 8889T konnten wir in unseren Untersuchungen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen neben ihrer selektiven Bindung an Zell-Zellkontakten auch im Zytosol identifizieren. PaTu 8889T exprimiert dabei allerdings die langen Isoformen viel stärker als PaTu 8889S und zeigt für diese im Gegensatz zu PaTu 8889S vor allem eine starke zytosolische Lokalisation. Die bereits angeführten Ergebnisse von Montonen et al. konnten zeigen, dass die lange Isoform 1 in ektodermalen Zellen kaum an Zell-Zellkontakten lokalisiert ist, Färbungen an Geweben von Mäusen zeigten dort lediglich eine schwache Expression. Dagegen zeigte sie sich vor allem in endothelialen und mikrovaskulären Geweben des Gehirns, der Retina und des kardiovaskulären Systems stark exprimiert.<sup>53</sup> Andere Gruppen konnten des Weiteren zeigen, dass besonders motile Zellen wie Fibroblasten und Makrophagen bevorzugt die langen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen exprimieren.<sup>51</sup> In ähnlicher Weise brachten Aho et al. die Translokation der Isoformen 1A, 2A und 3A aus dem Zytosol in den Zellkern von Keratinozyten mit der Ausbildung eines sogenannten „branching phenotype“ in Verbindung.<sup>2</sup> Überexpressionsexperimente von full-length-p120<sup>ctn</sup> zeigten dementsprechend in SV80-, NIH3T3- und CHO-Zellen eine vermehrte Ausbildung von Filopodien und eine Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit. Eine Erhöhung der Expression von p120<sup>ctn</sup> um das 10-fache führte dabei in SV80-Zellen zu

einer Auflösung von festen Zell-Zellkontakten.<sup>28</sup> Spezifische p120<sup>ctn</sup>-Isoformen blieben in diesen letztgenannten Versuchen zwar unberücksichtigt, das verwendete full-length-p120<sup>ctn</sup>-Konstrukt entspricht jedoch am ehesten den langen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen. Alle diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die langen Isoformen mit der Morphologie und der Migrationfähigkeit von Zellen in Verbindung stehen. Dabei scheint die Induktion von Zellmigration ein von der endogenen Konzentration von p120<sup>ctn</sup> abhängiger Prozess zu sein und mit der Auflösung fester Zelladhäsion einherzugehen. In unseren Experimenten zeigte die Zelllinie PaTu 8889T im Vergleich zu PaTu 8889S eine höhere endogene Konzentration der langen Isoformen und ein höheres Migrationspotential. Die starke Migrationsfähigkeit der Wildtyp-Zelllinie von PaTu 8889T könnte somit mit der endogen hohen intrazellulären Konzentration einer langen p120<sup>ctn</sup>-Isoform in Verbindung stehen. Neben der Bindung der an Zell-Zellkontakten bekannten kurzen Isoform 3 konnten unsere Experimente aber auch die spezifische Bindung einer langen Isoform der Gruppe 1 oder 2 an E-Cadherin in PaTu 8889S und den E-Cadherin exprimierenden Zellklonen von PaTu 8889T zeigen. Diese Bindung an die Zellmembran an Adherens Junctions konnte in der Literatur bislang nicht gezeigt werden. Dementsprechend könnte auch dieser Isoform analog zur kurzen Isoform-Gruppe eine E-Cadherin stabilisierende Rolle zugeschrieben werden. Die oben dargestellten Charakteristika der langen Isoformen lassen jedoch darauf schließen, dass dieser langen Isoform entsprechend ihrer Konzentration im Zytosol und Zellkern epithelialer Zellen vielmehr eine Rolle bei der Übermittlung migrations- und proliferationsinduzierender Signale in den Zellkern zukommt. Durch die Expression von E-Cadherin in PaTu 8889T konnte eine deutliche Abnahme der Migrationsfähigkeit und eine Veränderung der Morphologie erzielt werden. Die Bindung der langen p120<sup>ctn</sup>-Isoform an den Cadherin/Catenin-Komplex führte zu einer deutlichen Reduktion der endogenen Konzentration der langen p120<sup>ctn</sup>-Isoform im Zytosol von PaTu 8889T. Diese Relokalisation der langen p120<sup>ctn</sup>-Isoform aus dem Zytosol und vermutlich auch aus dem Zellkern an die Zellmembran könnte mit einer verminderten Signaltransduktion in den Zellkern einhergehen und ist vermutlich neben der E-Cadherin-vermittelten Haftung der Zellen an den Zellverband eine weitere Ursache für die verminderte Migrationsfähigkeit und die veränderte Morphologie der E-Cadherin exprimierenden PaTu 8889T-Zellen.

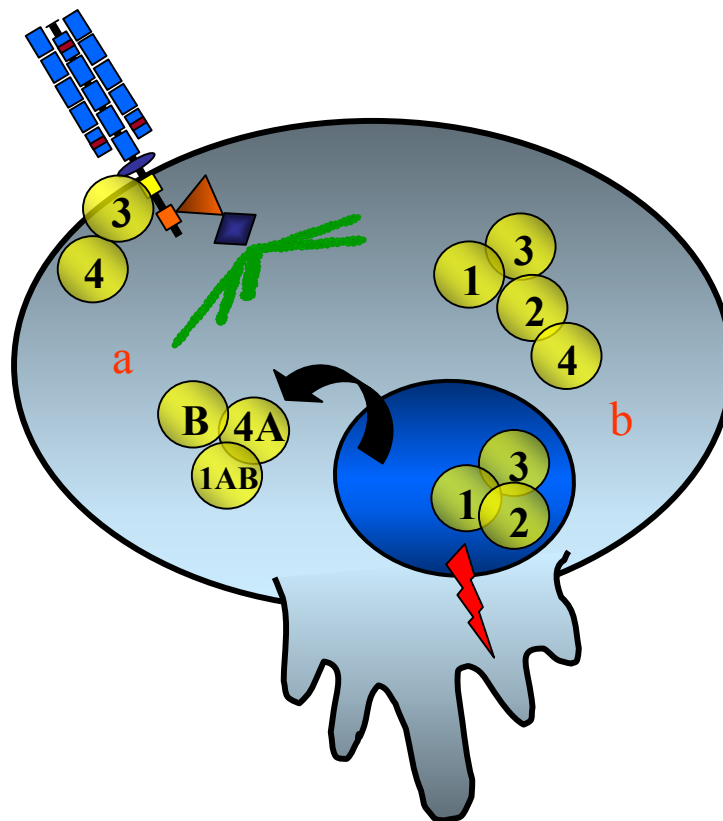
#### 4.2.4 Funktion der unterschiedlichen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen bei der Stimulation autonomen Zellwachstums

Viele Gruppen sehen in p120<sup>ctn</sup> und seinen Isoformen ein zentrales Regulationsorgan E-Cadherin vermittelter Zelladhäsion in epithelialen Zellverbänden. Auch unsere Beobachtungen konnten zeigen, dass Verschiebungen im Gleichgewicht bestimmter p120<sup>ctn</sup>-Isoformen mit Veränderungen im Zellwachstum und vor allem der Migrationsfähigkeit von Zellen assoziiert sind.

Die unterschiedlichen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen nehmen dabei anscheinend in unterschiedlicher Weise Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung malignen Wachstums. Diese Annahme spiegelt sich auch in der Beobachtung wider, dass eine Reihe verschiedener Tumorgewebe und Zelllinien sowohl reduzierte<sup>21,26</sup>, als auch abnorm gesteigerte p120<sup>ctn</sup>-Expression<sup>39,48</sup> zeigen. Der Mangel an vor allem kurzen, E-Cadherin stabilisierenden p120<sup>ctn</sup>-Isoformen kann daher vermutlich ebenso autonomes Wachstum und gesteigerte Zellmigration stimulieren, wie die Überexpression und Translokation bestimmter p120<sup>ctn</sup>-Isoformen in das Zytosol und den Zellkern. Die vermehrt gefundene Lokalisation der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen 1A, 2A und 3A im Zellkern von Keratinozyten mit folgender Induktion eines „branching Phenotype“<sup>2</sup>, sowie die vermehrte p120<sup>ctn</sup>-Expression der langen Isoformen in motilen Zellen<sup>51</sup> lassen den Schluss zu, dass die vermehrte Ansammlung vor allem dieser Isoformen und deren Translokation in den Zellkern in entarteten Zellen zu maligner Proliferation, Migration und Metastasierung führen könnten. Die Isoformen 4A und 1AB wiederum, denen keine nukleäre Lokalisation nachgewiesen werden konnte<sup>2</sup>, sowie die p120<sup>ctn</sup>-Isoformen, die das Exon B und somit eine Ausschleusungssequenz aus dem Nukleus enthalten<sup>79</sup>, scheinen dagegen nicht oder nur kurzfristig an einer Signalübermittlung in den Zellkern teilzunehmen. Das Vorhandensein dieser Isoformen spräche somit eher gegen die Stimulierung autonomen Wachstums.

Anhand unserer Untersuchungen lässt sich zeigen, dass es sich bei der Entstehung malignen Tumorwachstums um einen Prozess handelt, der sich im Verlust von E-Cadherin vermittelter Zelladhäsion sowohl an der Zelloberfläche, als auch über Verschiebungen im Gleichgewicht intrazellulärer Catenine in Zytosol und Zellkern abspielt. Je nach Funktion und Lokalisation können die Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes dabei stimulierend oder inhibierend auf die Entwicklung

malignen Wachstums einwirken. Besonders p120<sup>ctn</sup> zeigt dabei durch seine vielfältigen Isoformen große Variationsbreite. Je nach Isoformzusammensetzung, Lokalisation und Phosphorylierungszustand der einzelnen Isoformen kann p120<sup>ctn</sup> verschiedenste Effekte sowohl auf die durch Cadherine und Catenine gebildeten Zell-Zellkontakte, als auch im Rahmen von Signaltransduktionsprozessen auf den gesamten Zellzyklus haben. P120<sup>ctn</sup> kommt somit eine zentrale Rolle bei der Regulation sowohl physiologischer als auch autonomer Wachstumsprozesse zu. Die vermuteten Funktionen der unterschiedlichen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen bei der Regulation des Zellwachstums fasst Abbildung 20 zusammen.



**Abb.20 Funktion der verschiedenen p120<sup>ctn</sup>-Isoformen bei der Stimulation autonomen Zellwachstums**

**a** Die kurzen Isoformen 3 und 4 stabilisieren E-Cadherin an epithelialen Zell-Zellkontakten. Die Isoformen 4A und 1AB konnten nie im Zellkern nachgewiesen werden. Das am C-Terminus lokalisierte Exon B enthält ein nukleäres Export-Signal, welches die Ausschleusung der betreffenden Isoformen aller Gruppen aus dem Zellkern bewirken soll. Der Verlust dieser Isoformen könnte autonomes Zellwachstum stimulieren.

**b** Im Zellkern konnte eine Bindung von p120<sup>ctn</sup> an Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Die Isoformen 1A, 2A und 3A treten sowohl im Zytosol als auch im Zellkern auf. Hier werden sie mit der Ausbildung des sogenannten „branching phenotype“ in Verbindung gebracht. Motile Zellen exprimieren ebenfalls vor allem die „langen“ Isoformen. Die vermehrte Translokation dieser Isoformen in den Zellkern könnte autonomes Zellwachstum fördern.

### 4.3 PaTu 8889S und PaTu 8889T als Tumormodell

In unseren Analysen war es möglich, mit Hilfe von Zellkultur-Assays vor allem Proliferations- und Migrationseffekte zu beobachten. Die retrovirale Infektion von E-Cadherin in PaTu 8889T gab uns die Möglichkeit, Veränderungen in der Zusammensetzung des Cadherin/Catenin-Komplexes und in der Lokalisation der Bestandteile im direkten Vergleich zu analysieren und deren Auswirkungen auf die Wachstumseigenschaften zu betrachten. Unsere Untersuchungen an den PaTu-Zelllinien konnten zeigen, dass bereits geringe Veränderungen an der Oberfläche von Zellen eine Kette intrazellulärer Alterationen nach sich ziehen. Auch wenn allein der Verlust von E-Cadherin nicht den Prozess der Entstehung von Tumoren erklärt, lassen sich doch einzelne Mechanismen der Tumorentwicklung anhand unseres Tumormodells beobachten und nachvollziehen. Die genauen Mechanismen der Entstehung autonomen Wachstums sind noch immer weitgehend unbekannt. Die zentrale Rolle der Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes ist jedoch in unseren und anderen Experimenten gezeigt worden. Ausgehend von unseren Untersuchungen stellen sich nun weitere interessante Fragen, die mit Hilfe unseres Modells Aufschluss über die Funktion des Cadherin/Catenin-Komplexes geben können:

In Analogie zur Überexpression von E-Cadherin in PaTu 8889T könnten siRNA-Experimente für E-Cadherin bzw. der E-Cadherin bindenden p120<sup>ctn</sup>-Isoformen 1 und 3 in PaTu 8889S unsere bisherigen Experimente verifizieren oder ergänzen. Auch die Klonierung und Expression der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen könnte die bevorzugte Lokalisation und Funktion spezifischer p120<sup>ctn</sup>-Isoformen aufklären und Aufschluss über intrazelluläre Signaltransduktionswege geben. Eine spezifische Analyse ihrer subzellulären Lokalisation könnte unsere Vermutungen zur Translokation der p120<sup>ctn</sup>-Isoform 1 oder auch von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern von PaTu 8889T belegen. In der Analyse der Phosphorylierungsmechanismen von p120<sup>ctn</sup> bestehen darüberhinaus weitere interessante Untersuchungsoptionen. Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich mit der Charakterisierung der Wildtyp-Zelllinien um die Etablierung eines vielseitigen Tumor-Zellmodells. Die Analyse der Überexpression von E-Cadherin macht deutlich, auf welche Weise dieses System für die Aufklärung der Funktionen des Cadherin/Catenin-Komplexes nutzbar gemacht werden kann.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Anhand der Schwesterzelllinien PaTu 8889S und PaTu 8889T untersuchten wir den Einfluss des Cadherin/Catenin-Komplexes auf das Wachstum und die Migration von Tumorzellen. Zellmorphologie, Wachstums- und Migrationsprozesse wurden dabei mittels lichtmikroskopischer Beobachtungen und zellbiologischer Assays charakterisiert. Die lichtmikroskopische Beobachtung in Verbindung mit verschiedenen Zellkulturassays zeigte ein autonomeres Wachstumsverhalten der Zelllinie PaTu 8889T gegenüber der Zelllinie PaTu 8889S mit Verlust der Kontaktinhibition und verstärktem Migrationsverhalten. Mit dem Fehlen von E-Cadherin konnten wir einen entscheidenden Faktor für die Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zelllinien finden. Der Verlust von E-Cadherin zeigte Auswirkungen auf die Zusammensetzung und Lokalisation der intrazellulär gelegenen Catenine. Besonderes untersuchten wir hierbei p120<sup>ctn</sup>, welches durch eine auffallend heterogene Verteilung seiner Isoformen in PaTu 8889S und PaTu 8889T imponierte. Während PaTu 8889S multiple Isoformen exprimierte, kamen in PaTu 8889T nur zwei Isoformen zur Darstellung. Wir analysierten die Lokalisation der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen und seine Assoziation zum Cadherin/Catenin-Komplex. Hierbei wurde in PaTu 8889S vor allem eine kurze Isoform 3 an den Komplex gebunden, was für eine stabilisierende Wirkung spricht. Auch eine lange Isoform der Klasse 1 oder 2 wurde an den Cadherin/Catenin-Komplex gebunden. Weitere Isoformen zeigten sich im Zytosol von PaTu 8889S. In der Zelllinie PaTu 8889T wurden je eine lange und eine kurze Isoform gleich stark exprimiert, beide waren im Zytosol lokalisiert. Die Expression von E-Cadherin in PaTu 8889T führte zur Formation von Zell-Zellkontakten und veränderte neben der Morphologie auch die Wachstums- und Migrationseigenschaften der entstehenden Tumorzelllinie. Morphologisch formierten sich homogene Zellverbände aus flachen Einzelzellen mit einer Reduktion von Zellausläufern. In den Zellkulturassays zeigte sich eine Verhinderung von schneller Migration und die Induktion von Kontaktinhibition. Auch hier konnte die Assoziation der p120<sup>ctn</sup>-Isoformen 1 oder 2 und 3 an den Cadherin/Catenin-Komplex gezeigt werden. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Ausbildung E-Cadherin vermittelter Zell-Zellkontakte mit einer Bindung von stabilisierenden Cateninen wie der p120<sup>ctn</sup>-Isoform 3 an der inneren Zellmembran zu einer Reduktion autonomer Wachstumseigenschaften führt. Diese „Tumorsuppression“

ist nicht nur Folge der Einbindung der Zellen in den Zellverband durch die Ausbildung von Adherens Junctions, sondern auch der Konzentrationsverschiebung intrazellulärer Signaltransduktoren. Dabei spielt vor allem eine lange p120<sup>ctn</sup>-Isoform eine Rolle. Durch die Bindung an den Cadherin/Catenin-Komplex wird die zytosolische Konzentration der langen p120<sup>ctn</sup>-Isoform reduziert. Die so erreichte Hemmung der Übertragung von Wachstumssignalen in den Zellkern resultiert in der Verhinderung schneller Zellmigration und einer veränderten Zellmorphologie. Das so charakterisierte Zellmodell stellt ein sinnvolles System zur Funktionsanalyse der Bestandteile des Cadherin/Catenin-Komplexes dar.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahlgren J, Hill M, Roberts I (1992) Pancreatic cancer: patterns, diagnosis and approaches to treatment. *Gastrointestinal Oncology.*, pp. 197-207. J.B. Lippincott Corointestinal oncology, Philadelphia
2. Aho S, Levansuo L, Montonen O, Kari C, Rodeck U, Uitto J (2002) Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells. *J Cell Sci* 115: 1391-1402
3. Aono S, Nakagawa S, Reynolds AB, Takeichi M (1999) p120(ctn) acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells. *J Cell Biol* 145: 551-562
4. Bansal P, Sonnenberg A (1995) Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer. *Gastroenterology* 109: 247-251
5. Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA (1983) Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* 49: 140-147
6. Beck J (1941) Diagnosis of carcinoma of the pancreas. *Archives of Internal medicine* 68: 525-529
7. Becker N, Wahrendorf J (1998) *Krebsatlas der BRD*. Springer Verlag, Berlin
8. Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W (1993) Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* 120: 757-766



9. Ben Ze'ev A, Geiger B (1998) Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 10: 629-639
10. Bockman DE, Buchler M, Beger HG (1994) Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Gastroenterology* 107: 219-230
11. Bradley RS, Cowin P, Brown AM (1993) Expression of Wnt-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and E-cadherin and increased cellular adhesion. *J Cell Biol* 123: 1857-1865
12. Brady-Kalnay SM, Rimm DL, Tonks NK (1995) Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo. *J Cell Biol* 130: 977-986
13. Braga VM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA (1997) The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* 137: 1421-1431
14. Breen E, Clarke A, Steele G, Jr., Mercurio AM (1993) Poorly differentiated colon carcinoma cell lines deficient in alpha-catenin expression express high levels of surface E-cadherin but lack Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun* 1: 239-250
15. Bunn HF (1997) Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 337: 762-769
16. Caveda L, Martin-Padura I, Navarro P, Breviario F, Corada M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E (1996) Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest* 98: 886-893
17. Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ (2003) p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* 163: 547-557

18. Dale TC (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 329 ( Pt 2): 209-223
19. Daniel JM, Reynolds AB (1999) The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* 19: 3614-3623
20. Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* 163: 525-534
21. Dillon DA, D'Aquila T, Reynolds AB, Fearon ER, Rimm DL (1998) The expression of p120ctn protein in breast cancer is independent of alpha- and beta-catenin and E-cadherin. *Am J Pathol* 152: 75-82
22. Ehrental D, Haeger L, Griffin T, Compton C (1987) Familial pancreatic adenocarcinoma in three generations. A case report and a review of the literature. *Cancer* 59: 1661-1664
23. Elsasser HP, Lehr U, Agricola B, Kern HF (1992) Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 61: 295-306
24. Gall FP, Kessler H, Hermanek P (1991) Surgical treatment of ductal pancreatic carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 17: 173-181
25. Gamallo C, Palacios J, Suarez A, Pizarro A, Navarro P, Quintanilla M, Cano A (1993) Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol* 142: 987-993
26. Gold JS, Reynolds AB, Rimm DL (1998) Loss of p120ctn in human colorectal cancer predicts metastasis and poor survival. *Cancer Lett* 132: 193-201
27. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65: 475-502

28. Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M, Bershadsky AD (2001) 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
29. Grundmann E (1981) [Mechanisms of malignant growth (author's transl)]. *Klin Wochenschr* 59: 931-941
30. Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514
31. Harris CC, Autrup HN (1983) Human carcinogenesis. Academic press
32. Hermanek Pea (1987) TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Springer Verlag, Berlin
33. Hinck L, Nelson WJ, Papkoff J (1994) Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *J Cell Biol* 124: 729-741
34. Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R (1994) Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 127: 1375-1380
35. Howe GR, Jain M, Burch JD, Miller AB (1991) Cigarette smoking and cancer of the pancreas: evidence from a population-based case-control study in Toronto, Canada. *Int J Cancer* 47: 323-328
36. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90: 871-882
37. Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J (1994) E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 127: 2061-2069
38. Ireton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F,

- Reynolds AB (2002) A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* 159: 465-476
39. Jawhari AU, Noda M, Pignatelli M, Farthing M (1999) Up-regulated cytoplasmic expression, with reduced membranous distribution, of the src substrate p120(ctn) in gastric carcinoma. *J Pathol* 189: 180-185
40. Keirsebilck A, Bonne S, Staes K, van Hengel J, Nollet F, Reynolds A, van Roy F (1998) Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics* 50: 129-146
41. Klöppel G, Solcia E, Longnecker D, Capella C, Sobin L (1996) Histological typing of tumours of the exocrine pancreas. Springer Verlag, Berlin
42. Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ (1995) Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol* 130: 67-77
43. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science* 275: 1784-1787
44. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH (1983) Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 49: 636-649
45. Malagelada JR (1979) Pancreatic cancer: an overview of epidemiology, clinical presentation, and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 54: 459-467
46. Mariner DJ, Wang J, Reynolds AB (2000) ARVCF localizes to the nucleus and adherens junction and is mutually exclusive with p120(ctn) in E-cadherin complexes. *J Cell Sci* 113 ( Pt 8): 1481-1490
47. Matsuyoshi N, Hamaguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M (1992) Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol* 118: 703-714

48. Mayerle J, Friess H, Buchler MW, Schnekenburger J, Weiss FU, Zimmer KP, Domschke W, Lerch MM (2003) Up-regulation, nuclear import, and tumor growth stimulation of the adhesion protein p120 in pancreatic cancer. *Gastroenterology* 124: 949-960
49. McCrea PD, Gumbiner BM (1991) Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin). Characterization and extractability of the protein complex from the cell cytostructure. *J Biol Chem* 266: 4514-4520
50. Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA (1995) The molecular basis of cancer. Conference Proceedings
51. Mo YY, Reynolds AB (1996) Identification of murine p120 isoforms and heterogeneous expression of p120cas isoforms in human tumor cell lines. *Cancer Res* 56: 2633-2640
52. Moll R, Mitze M, Frixen UH, Birchmeier W (1993) Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* 143: 1731-1742
53. Montonen O, Aho M, Uitto J, Aho S (2001) Tissue distribution and cell type-specific expression of p120ctn isoforms. *J Histochem Cytochem* 49: 1487-1496
54. Moosa A, Camagami R (1995) Diagnosis and staging of pancreatic neoplasms. *Surgical Clinics of North America* 74: 871-890
55. Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S (1991) The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 65: 849-857
56. Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM (1996) Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380: 360-364
57. Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S (1998) Cell adhesion and the integrin-

- linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4374-4379
58. Ohkubo T, Ozawa M (1999) p120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. *J Biol Chem* 274: 21409-21415
59. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M, . (1993) Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 53: 1696-1701
60. Ozawa M, Ringwald M, Kemler R (1990) Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4246-4250
61. Peifer M, Yap AS (2003) Traffic control: p120-catenin acts as a gatekeeper to control the fate of classical cadherins in mammalian cells. *J Cell Biol* 163: 437-440
62. Peiper H (1994) Pankreas. In Berchtold R, Hamelmann H, Peiper H, Trentz O (eds) *Chirurgie*, pp. 643-656. Urban & Fischer, Kiel
63. Pizarro A, Benito N, Navarro P, Palacios J, Cano A, Quintanilla M, Contreras F, Gamallo C (1994) E-cadherin expression in basal cell carcinoma. *Br J Cancer* 69: 157-162
64. Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z (1994) Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 14: 8333-8342
65. Reynolds AB, Roesel DJ, Kanner SB, Parsons JT (1989) Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol Cell Biol* 9: 629-638

66. Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS (1995) Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8813-8817
67. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P (1993) Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262: 1731-1734
68. Scarpa A, Capelli P, Mukai K, Zamboni G, Oda T, Iacono C, Hirohashi S (1993) Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am J Pathol* 142: 1534-1543
69. Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W (1991) E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 51: 6328-6337
70. Schmähl D (2003) *Maligne Tumoren- Entstehung, Wachstum, Chemotherapie.* Edition Cantor, Aulendorf,
71. Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374: 327-337
72. Shen SH, Bastien L, Posner BI, Chretien P (1991) A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature* 352: 736-739
73. Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Oku N, Miyazawa K, Kitamura N, Takeichi M, Ito F (1994) Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes Commun* 1: 295-305

74. Shore EM, Nelson WJ (1991) Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 266: 19672-19680
75. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW (1993) Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262: 1734-1737
76. Takahashi K, Nakanishi H, Miyahara M, Mandai K, Satoh K, Satoh A, Nishioka H, Aoki J, Nomoto A, Mizoguchi A, Takai Y (1999) Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J Cell Biol* 145: 539-549
77. Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y (1997) Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* 139: 1047-1059
78. Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hummingbird DK, Reynolds AB (2000) Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* 148: 189-202
79. van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, van Roy F (1999) Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7980-7985
80. Vermeulen SJ, Bruyneel EA, Bracke ME, De Bruyne GK, Vennekens KM, Vleminckx KL, Berx GJ, van Roy FM, Mareel MM (1995) Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of alpha-catenin in human colon cancer cells. *Cancer Res* 55: 4722-4728
81. Weiss EE, Kroemker M, Rudiger AH, Jockusch BM, Rudiger M (1998) Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol* 141: 755-764



82. Xiao K, Allison DF, Buckley KM, Kottke MD, Vincent PA, Faundez V, Kowalczyk AP (2003) Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* 163: 535-545
83. Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM (1998) The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* 141: 779-789
84. Zander NF, Cool DE, Diltz CD, Rohrschneider LR, Krebs EG, Fischer EH (1993) Suppression of v-fms-induced transformation by overexpression of a truncated T-cell protein tyrosine phosphatase. *Oncogene* 8: 1175-1182

## 7. DANKSAGUNG

Am Ende einer so langen Zeit auf dem manchmal schweren Weg zum Dokortitel gilt es vielen Menschen zu danken:

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. M.M. Lerch für die konstruktive und geduldige Betreuung der vorliegenden Arbeit danken, vor allem aber für die Offenheit für neue Ideen und das Interesse daran, das gegebene Thema von den unterschiedlichsten Seiten zu beleuchten. Nicht zuletzt außerdem für das in mich gesetzte Vertrauen, das mich sehr motiviert hat.

Ebenfalls danken möchte ich meinem Betreuer Jürgen Schnekenburger, der mir in allen technischen und alltäglichen Fragen zur Seite gestanden hat.

Außerdem möchte ich mich bei Julia Mayerle und Ullrich Weiss bedanken, bei denen ich offene Türen eingerannt bin mit allen Problemen, die das Dasein im Labor schwierig, aber auch interessant gemacht haben. Mit ihrer Hilfe wurde mein Interesse an der Forschung geweckt und meine Frustrationstoleranz vor manche Bewährungsprobe gestellt. Aber auf diese Weise blieb auch die menschliche Seite in den vergangenen zwei Jahren nicht auf der Strecke. Ihr Weggehen aus Münster riss ein Loch sowohl in meinen Terminkalender als auch in meine Telefonkasse und lässt mich auf eine Fahrkarte an die Ostsee hoffen.

Nicht zuletzt danke ich allen anderen, die mich im Labor begleitet haben: Iris Keiner, meiner Begleiterin in allen Studiums- und sonstigen Fragen, Peter Simon, dem Initiator des ganzen Dilemmas, Verena Hlouschek, Ralf Niehues, Manuel Ruthenbürger, Ina Weber, Alexander Aghdhassi und allen anderen, die ich jetzt vielleicht vergessen habe. Auch außerhalb der Klinik haben einige zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen. Meine Freunde, meine „Managerin“ und meine Familie, die mich immer bedingungslos unterstützt haben. Die letzten Zeilen gelten Philipp, der mich und meinen Computer stets wieder aufgerichtet hat, wenn wir abzustürzen drohten. Ihm gehört mein Herz und mein ganz besonderer Dank.

## 8. LEBENSLAUF

Ulrike Neuhaus  
Kortumstrasse 6  
30171 Hannover

---

geboren am 25.12.1976 in Lüdinghausen/Westfalen als zweite von drei Töchtern von Manfred Neuhaus (Lehrer Sekundarstufe 2 in den Fächern Französisch und Geografie) und Annette Neuhaus (Lehrerin Sekundarstufe 1 in den Fächern Deutsch und Geografie)

### **Bildungsweg:**

- 1983-1987 Besuch der kath. Ostwall-Grundschule in Lüdinghausen
- 1988-1996 Besuch des altsprachlich orientierten Gymnasium Canisianum in Lüdinghausen
- Mai 1996 Abitur (Note 1,3); Schwerpunkte: Naturwissenschaften, Geschichte und Sport

### **Medizinische Ausbildung:**

- 1996-1997 Freiwilliges Soziales Jahr im Rahmen eines Projektes des Bischöflichen Generalvikariats im Pflegedienst auf einer 39 Betten umfassenden Station in der Inneren Medizin des Clemens-Hospitals in Münster
- WS1997/98 Beginn des Studiums der Human-Medizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- 1999 Physikum (Note: befriedigend)
- 2000 Erstes Staatsexamen (Note: befriedigend)
- 2000 Beginn der experimentellen Arbeit zu der vorliegenden Dissertation in der Inneren Abteilung der Westfälischen Wilhelms-Universität zum Thema: Die Rolle von Zelladhäsionsproteinen im duktalem Adenokarziom des Pankreas. Die Arbeit wird betreut durch Prof. Dr. M.M. Lerch, zuletzt lfd. OA der Medizinischen Klinik B, Westfälische Wilhelms Universität Münster, jetzt Leiter der Medizinischen Klinik A der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.

