

Der Einfluß von E-Cadherin  
und des Zellkontaktes  
auf das Genexpressionsprofil  
von MDA-MB-435S Zellen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
an der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Vorgelegt von  
Holger Laux aus München  
Februar 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. H. Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 25. August 2006

Aufrichtig möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H. Höfler danken, der mir als Direktor des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München (TUM) und des Instituts für Pathologie der GSF, die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation zu erstellen. Die ausgezeichnete Ausstattung seiner beiden Institute hat wesentlich zur Durchführung vieler Experimente und der Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. habil. K.-F. Becker für die Überlassung des Themas der Dissertation und die Betreuung und Unterstützung während des gesamten Projektes. Herr Dr. habil. K.-F. Becker hat sich mit großem Interesse am Fortgang dieser Arbeit beteiligt.

Mein Dank gilt auch insbesondere Frau Prof. Eckardt-Schupp für die durchgehende hervorragende Betreuung und Vertretung der Arbeit innerhalb der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ganz besonders danke ich meinen Kollegen und Freunde Frau Dr. X. Mazur, Dr. E. Rosivatz, Dr. F. Graedler und Herrn Dr. J. Mages, die mich auch in schwierigen Phasen ermutigten und motivierten, für die zahlreichen hilfreichen wissenschaftlichen Ratschläge und die vielen geselligen Stunden, nicht nur innerhalb des Instituts.

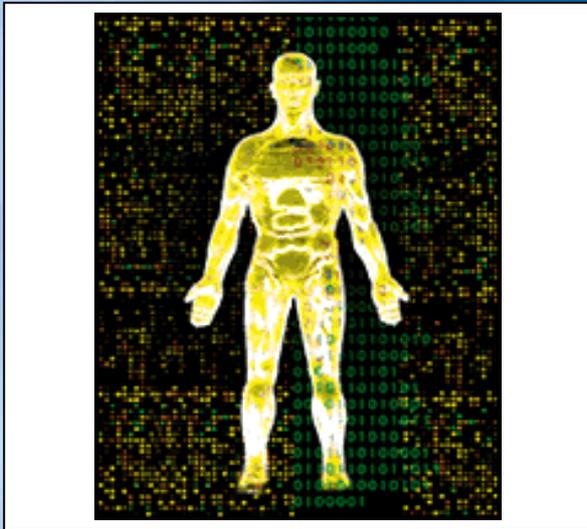
Wesentlich zum Gelingen meiner Dissertation haben auch Herr Dr. J. Smida, Frau M. Blöching, Frau D. Angermeier, Dr. D. Sagan und Herr U. Schnitzbauer aus der GSF (Neuherberg) beigetragen, wofür ich mich aufrichtig bei Ihnen bedanke. Sie haben mir sowohl bei der Durchführung als auch der Validierung meiner Mikroarrayexperiment unterstützt. Bei Frau D. Angermeier und Dr. Smida bedanke ich mich auch sehr herzlich für die große Hilfsbereitschaft und das Korrekturlesen der Dissertation.

Herrn Mader, Herrn Budzies und Herrn Raju danke ich für die gute Zusammenarbeit in der Normalisierung und Auswertung der Mikroarray Daten.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der TU und der GSF sage ich herzlichen Dank für die freundliche Hilfe. Hier möchte ich mich vor allem bei Frau C. Hermanstätter, Frau S. Rauser, Dr. F. Neff, Herrn V. Metzger, Frau B. Geist, Herrn S. Warneke, Frau C. Schott, Frau I. Brunner und Dr. R. Napiralski bedanken, die durch technische Expertise und/oder stetige Diskussionsbereitschaft zum Erfolg dieser Studie beigetragen haben. Unter diesen Bedingungen war es mir immer eine große Freude hier zu arbeiten.

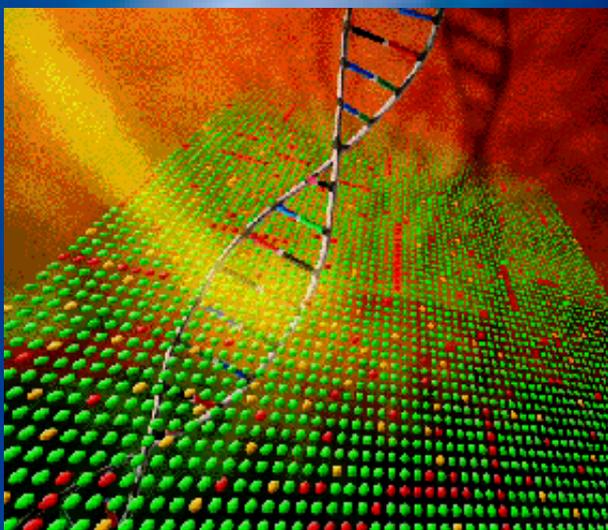
Herzlichen Dank auch an die Kooperationspartner Dr. Adamski (Institut für experimentelle Genetik der GSF), Dr. Truss aus der Humboldt Universität und Dr. N. Schütze aus dem Universitätsklinikum Würzburg.

Zum Schluss möchte ich von ganzem Herzen meiner Mutter danken, die mir das Studium und die Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht haben. Sie war mir immer eine sehr große Stütze in jeglicher Hinsicht.



Der Einfluß  
von  
E-Cadherin  
und  
des  
Zellkontaktes

auf das  
Genexpressionsprofil  
von  
MDA-MB-435S  
Zellen



Holger Laux

<b>A</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>B</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>E-Cadherin .....</b>	<b>5</b>
1.1	E-Cadherin Mutationen .....	6
<b>2</b>	<b>WNT-Signalweg .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Das Magenkarzinom .....</b>	<b>11</b>
3.1	Allgemeines zum Magenkarzinom .....	11
3.2	Mögliche Ursachen für die Entstehung eines Magenkarzinoms .....	12
3.2.1	Endogene Risikofaktoren (Risikosteigernde Erkrankungen) .....	12
3.2.2	Exogene (Umwelt-) Risikofaktoren .....	13
3.3	Klassifizierung des Magenkarzinoms .....	14
<b>4</b>	<b>EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION .....</b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>Wundheilung .....</b>	<b>16</b>
5.1	Allgemeines .....	16
5.2	Entzündungsreaktion .....	17
5.3	Epithelialisierung .....	18
5.4	Bildung von granulozytärem Gewebe .....	19
5.5	Neovaskularisation .....	19
5.6	Weitere wundheilungsrelevante Faktoren .....	19
5.6.1	Matrix Metalloproteinasen .....	19
5.6.2	Angiogenese Faktor CYR61 .....	20
5.6.3	SPARC .....	20
<b>6</b>	<b>Mikroarray .....</b>	<b>21</b>
6.1	Allgemeines zu Mikroarrays .....	21
6.2	Herstellung von Mikroarrays .....	22
6.3	cDNA Markierung und Mikroarray Hybridisierung .....	25
6.4	Fehlerquellen bei Mikroarray Experimenten .....	27
6.5	Prozessierung der Mikroarray Daten .....	28
6.6	Dateninterpretation .....	30
6.7	MIAME (Minimum Information About Mikroarray Experiment) .....	31
6.8	Mikroarray Applikationen und Ausblick .....	32
6.9	Ziel der Arbeit .....	33
<b>C</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>34</b>
<b>1.</b>	<b>Material .....</b>	<b>34</b>
1.1	Geräte .....	34
1.2	Chemikalien .....	35
1.3	Antibiotika .....	35
1.4	Enzyme .....	36
1.5	Zelllinien .....	36
1.6	Zellkulturmedien .....	37
1.7	Reagenzien und Zusätze für eukaryotische Zellkultur .....	37
1.8	Reagenzien und Medien zur Anzucht von Escherichia coli .....	37
1.9	Kommerzielle Komplettsysteme .....	38
1.10	Allgemeine Puffer und Lösungen .....	38
1.11	Antikörper .....	39
1.12	cDNA Klone .....	40
1.13	Vektor und Plasmide .....	40
1.14	Oligonukleotide, Primer und siRNAs .....	40
1.15	Verbrauchsmaterial .....	41
<b>2.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>42</b>
2.1	Auswahl der Klone .....	42

2.2	Anzucht von E.coli .....	43
2.3	Plasmidaufreinigung im kleinen Maßstab („Mini-Präp“).....	43
2.4	Sequenzierung der I.M.A.G.E.-Klone .....	43
2.5	Plasmidaufreinigung im Hochdurchsatz Verfahren.....	44
2.6	Amplifikation der cDNA-Insertionen der I.M.A.G.E.-Klone durch PCR.....	44
2.7	Aufreinigung und Vermessung der PCR-Fragmente.....	45
2.8	Herstellung der Mikroarrays.....	46
2.9	Waschen und Prähybridisieren der aldehydbeschichteten Objektträger.....	46
2.10	Hybridisierung der aldehydbeschichteten Objektträger.....	47
2.11	Scannen der Mikroarrays.....	47
2.12	Auswertung der Mikroarrays.....	48
2.13	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	48
2.14	Isolierung von RNA aus Zellen .....	49
2.16	Reverse Transkription.....	50
2.16.1	cDNA Synthese.....	50
2.16.2	Aminoallyl markierte cDNA-Synthese und Hybridisierungsvorbereitung.....	50
2.16.3	Cy3/Cy5 markierte cDNA Synthese und Hybridisierungsvorbereitung.....	50
2.17	Northern Blot Analyse.....	51
2.18	Quantitative Realtime RT PCR .....	51
2.19	Amplifikation eines E-Cadherin Promotor-SNP an Position -160 .....	53
2.20	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) .....	53
2.21	Klonierung des Puromycinresistenzgens in pSuper siRNA Vektoren.....	54
2.22	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen .....	55
2.23	Selektion mit DynaBeads .....	55
2.24	Diff-Quick-Färbung zur Dokumentation der Zelldichte.....	56
2.25	Herstellung von Protein-Lysaten aus eukaryotischen Zellen.....	56
2.26	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	57
2.27	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	57
2.28	Western Blot Analysen.....	57
2.29	Durchflusszytometrische Analyse (FACS).....	58
2.30	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	58
<b>D</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
<b>1</b>	<b>Etablierung der Mikroarray Methodik.....</b>	<b>59</b>
1.1	Austesten von unterschiedlich beschichteten Mikroarray Objektträgern .....	59
1.2	Sequenzierung und unterschiedliche PCR-Aufreinigungstechniken .....	61
1.3	Direkte versus indirekte cDNA Markierung.....	62
1.4	Reproduzierbarkeit der Mikroarray Daten.....	64
1.5	Sensitivität des Mikroarrays .....	65
1.6	Normalisierung .....	66
1.7	Zusammenfassung der Mikroarray Etablierung.....	68
<b>2</b>	<b>Mikroarray Daten von MDA-MB-435S mit unterschiedlichem E-Cadherinstatus .....</b>	<b>69</b>
2.1	Herauf- und herabregulierte Gene für jede Zelllinie.....	69
2.2	Biologische Bedeutung der differentiell exprimierten Gene .....	70
2.2	Validierung der Mikroarray Daten mittels Northern Blot Analysen.....	72
2.3	Validierung der Mikroarray Daten mittels quantitativer realtime RT PCR.....	73
2.4	Vergleich der Northern Blot Analysen mit quantitativen realtime RT PCRs.....	74
2.5	Clusteranalysen.....	75
<b>3</b>	<b>Einfluss des Zellkontakts auf den WNT-Signalweg .....</b>	<b>77</b>
3.1	Einfluss von E-Cadherin auf den WNT-Signalweg.....	77
3.2	Proteinexpressionsdaten zu den Tcf/Lef transkribierten Genen .....	80
<b>4</b>	<b>Expression von in der Wundheilung und Metastasierung involvierten Gene.....</b>	<b>81</b>
4.1	Differentielle Expression von MMP3, CYR61 und VEGFC.....	81
4.2	Funktionsanalysen mit aufgereinigtem CYR61 Protein .....	83
4.3	Einfluss von CYR61 und CDH1 siRNA-Vektoren auf die Genexpression.....	83
<b>5</b>	<b>Einfluss der Zelldichte auf das Genexpressionsprofil.....</b>	<b>85</b>
5.1	Expressionsunterschiede bei Zellwachstum über sieben Tage .....	86

5.2	Expressionsunterschiede bei drei unterschiedlichen Zelldichten.....	87
5.3	Einfluss der Zelldichte auf den WNT Signalweg .....	91
<b>6</b>	<b>Expressionsprofil von E-Cadherin-Repressoren .....</b>	<b>91</b>
6.1	Einfluss von E-Cadherin auf die Genexpression von E-Cadherin Repressoren .....	91
6.2	Einfluss von unterschiedlichen Zelldichten auf die Genexpression von E-Cadherin Repressoren.....	92
<b>7</b>	<b>Häufigkeit des E-Cadherin SNP-Polymorphismus an Position -160 in Magenkarzinomen .....</b>	<b>94</b>
<b>E</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>96</b>
<b>1.</b>	<b>Mikroarrays.....</b>	<b>96</b>
1.1	Vergleich von unterschiedlichen cDNA Markierungsmethoden .....	96
1.2	Vergleich von unterschiedlichen Normalisierungsstrategien.....	98
1.3	Vergleich von unterschiedlichen Validierungen.....	99
<b>2.</b>	<b>Der Einfluss des Zellkontaktes auf den WNT Signalweg .....</b>	<b>100</b>
2.1	Der Einfluss von E-Cadherin auf den WNT Signalweg .....	100
2.2	Der Einfluss der Zelldichte auf den WNT Signalweg .....	105
<b>3.</b>	<b>Die Matrix Metalloproteinasen 1, 3 und 9 werden von E-Cadherin beeinflusst.....</b>	<b>106</b>
<b>4.</b>	<b>Verringerter Zell-zu-Zellkontakt beeinflusst in der Metastasierung involvierte Gene .....</b>	<b>108</b>
4.1	E-Cadherin abhängige CYR61 Expression und dessen Einfluss auf Wundheilungsgene .....	108
4.2	Der Einfluss von E-Cadherin auf die Expression von Proliferations- und Angiogenesefaktoren.....	111
4.2.1	VEGFC .....	111
4.2.2	SPARC.....	112
4.2.3	PTN.....	113
4.2.4	MXI1.....	114
4.2.5	PRKCD .....	114
4.2.6	PRLR .....	115
4.2.7	STAT5a.....	116
4.2.8	TIMP3.....	116
4.3	E-Cadherin abhängige Veränderung der extrazellulären Matrix .....	117
4.3.1	ITGA3.....	117
4.3.2	PLAUR .....	119
4.3.3	LRP.....	120
4.3.4	LASP1.....	120
4.4	Weitere durch E-Cadherin in der Genexpression beeinflusste tumorrelevante Gene .....	121
4.4.1	MSH6.....	121
4.4.2	KAI-1.....	121
4.5	Zusammenfassung des Metastasierungsprozesses .....	122
4.6	Einfluss von E-Cadherin auf Magenkarzinom relevante Gene.....	124
4.7	Einfluss von E-Cadherin auf Wundheilung relevante Gene.....	124
4.8	Einfluss von Zell-zu-Zellkontakt auf E-Cadherin Repressoren und EMT .....	126
4.8.1	Einfluss von defektem E-Cadherin auf E-Cadherin Repressoren und EMT .....	126
4.8.2	Einfluss der Zelldichte auf E-Cadherin Repressoren und EMT .....	127
4.9	Zelldichte abhängige Veränderung der Genexpression .....	128
<b>5.</b>	<b>Häufigkeit und Einfluss des -160 SNP im E-Cadherin Promoter .....</b>	<b>129</b>
<b>G</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>131</b>
<b>H</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>143</b>
<b>1.</b>	<b>Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien und Enzyme .....</b>	<b>143</b>
<b>2.</b>	<b>Abkürzungen von Gennamen .....</b>	<b>144</b>
<b>I</b>	<b>PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....</b>	<b>146</b>

## A Zusammenfassung

Maligne Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, sich vom Primärtumor zu lösen und Metastasen zu bilden. Ein Verlust oder Mutationen im Kalzium-abhängigen, homophilen Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin korrelieren häufig mit der Metastasierung epithelialer Tumore. Vorarbeiten haben gezeigt, dass in humanen E-Cadherin negativen MDA-MB-435S Zellen die Transfektion von bestimmten mutierten E-Cadherin Genen zu einer reduzierten Adhäsion, erhöhten Motilität und veränderten Zellmorphologie führt. Basierend auf diesen Vorarbeiten war das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, welchen Einfluß mutierte E-Cadherine und der Zellkontakt auf das Genexpressionsprofil haben.

Das Genexpressionsprofil wurde mittels eines im Rahmen dieser Arbeit etablierten 1259 Sonden (~899 Gene) umfassenden cDNA Mikroarrays bestimmt. Es konnten 88 Prozent der mittels des cDNA Mikroarrays gefundenen Genexpressionsunterschiede durch die Validierung mit Northern Blot Analyse und 94 Prozent durch quantitative realtime RT PCR im Bezug auf die Richtung der Genexpressionsveränderung bestätigt werden.

Mit Hilfe des cDNA Mikroarrays wurde der Einfluß von E-Cadherin auf den WNT-Signalweg untersucht. Die in dieser Arbeit durchgeführten Gen- und Proteinexpressionsuntersuchungen zeigten, dass der E-Cadherin Status die Expression der im WNT-Signalweg involvierten Gene DKK1, SFRP1, SFRP3, CTNNAL1 und FZD7 so beeinflusst, dass die  $\beta$ -Catenin Menge in der Zelle stabil gehalten wird. Diese Ergebnisse wurden bereits in Laboratory Investigation (Laux et al., 2004) publiziert.

Die Zelllinien, die aufgrund von E-Cadherin Mutationen den Zell-zu-Zellkontakt verloren haben, zeigten eine differentielle Expression von Genen, die in der Angiogenese, Proliferation, Matrix Degradierung und Motilität involviert sind. Viele dieser Gene spielen in der Metastasierung als auch in der Wundheilung eine wichtige Rolle.

Die Zelllinie mit WT E-Cadherin Status hat einen engen Zell-zu-Zellkontakt und zeigte eine erhöhte Expression von E-Cadherin Repressoren im Vergleich zu den E-Cadherin negativen oder mutierten Zelllinien. Bei einer hohen Zelldichte konnte ebenfalls eine erhöhte Genexpression der E-Cadherin Repressoren detektiert werden. Die Zelllinien erkennen sensitiv den Zell-zu-Zellkontakt Status und regulieren daraufhin autokrin den E-Cadherin Status über eine veränderte Expression der E-Cadherin Repressoren. Eine Regulation des E-Cadherin Status war bei den hier verwendeten Zelllinien aber aufgrund eines artfremden  $\beta$ -Aktin Promotors vor den E-Cadherin Konstrukten nicht möglich.

Um festzustellen, inwieweit der Zell-zu-Zellkontakt für die E-Cadherin abhängige differentielle Expressionen verantwortlich ist, wurde dessen Einfluß auf das Genexpressionsprofil mittels Zelldichteversuche untersucht. Bei einer geringen Zelldichte, bei der die Zellen wenig Kontakt zueinander haben, korrelieren die Genexpressionsveränderungen mit denen der Zelllinien, die aufgrund von E-Cadherin Mutationen keinen Zell-zu-Zellkontakt haben.

Die vorliegende Arbeit hat zur Identifikation von Genen, welche eine wichtige Rolle in der durch mutiertes E-Cadherin vermittelten Invasion spielen (z.B. MMP1, MMP3, VEGFC, SPARC, ITGA3, CYR61, TIMP3, PRKCD, MXI1, PRLR, PLAUR und LASP1), beigetragen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Zellkontakt maßgeblich an der differentiellen Expression deren Gene beteiligt ist. Weiterführende Studien können nun die gefundenen Kandidatengene bezüglich Diagnose und Therapie von malignen Tumoren mit E-Cadherin Mutationen genauer charakterisieren. Die Inhibition einiger dieser Proteine stellt einen viel versprechenden Therapieansatz zur Behandlung dieser Tumoren dar.

## B Einleitung

Bei vielen - wenn nicht sogar bei allen - Schritten der Tumor Metastasierung spielen Zell-zu-Zell und Zell-zu-Matrix Interaktionen eine wichtige Rolle. Eine Grundvoraussetzung für die Metastasierung von Karzinomen ist die Ablösung einzelner Karzinomzellen aus dem Primärtumor. Im normalen Epithel ist die unkontrollierte Absiedelung von Einzelzellen aus dem Verband ins Stroma durch unterschiedlich starke Adhäsionsmechanismen unterbunden. Ein wesentlicher Faktor hierbei ist die Funktion des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin. Solange E-Cadherin funktionell aktiv ist, kommt es zu keiner Ablösung von Zellen aus einem Gewebeverband. In vielen Magenkarzinomen wird E-Cadherin exprimiert, dennoch lösen sich die Zellen voneinander ab und wachsen ins umliegende Mesenchym ein. Mutationen im Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin treten in ca. 50% diffuser Magenkarzinome gehäuft im Exon 8 oder 9 auf.

### 1 E-Cadherin

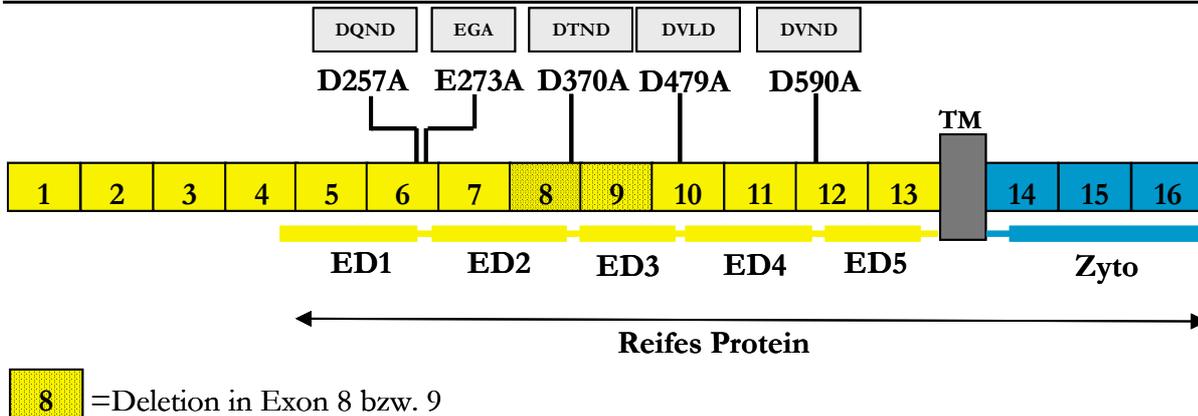
Cadherine sind für Vorgänge, welche die Zell zu Zell Adhäsion betreffen, von Bedeutung. Ihre Expression ist exakt kontrolliert und jedes Gewebe oder Zelltyp ist durch ein bestimmtes Cadherin Expressionsmuster charakterisiert (Nollet et al., 2000). Veränderungen in der Expression oder Funktionalität von Cadherinen wurden in menschlichen malignen Tumoren detektiert, welche in vielen Fällen zu einer verstärkten Invasion und Metastasierung der Krebszellen führte. Zur Gruppe der Cadherine gehören eine Vielzahl von Proteinen, die aufgrund der Zusammensetzung der Proteindomänen, der Genomstruktur und der phylogenetischen Analyse in sechs Unterfamilien eingeteilt werden (Nollet et al., 2000): die klassischen oder Typ I Cadherine, die atypischen oder Typ II Cadherine, Desmocolline, Desmogleine, Protocadherine und Flamingo Cadherine. Das zu den klassischen Cadherinen zählende E(epitheliale)-Cadherin ist zur Zeit am besten untersucht und wird als Prototyp Molekül für die gesamte Cadherin Unterfamilie (Nollet et al., 2000) angesehen. Cadherine gehören zu den transmembranen Glykoproteinen, die kalziumabhängig die Zelladhäsion vermitteln und so die Morphogenese von Organen bewerkstelligen (Takeichi, 1993). E-Cadherin wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt und ist deshalb unter verschiedenen Synonymen beschrieben worden. Als L-Cam wurde es im Huhn (Gallin et al., 1983), als Uvomorulin in der Maus (Schuh et al., 1986), als cell-Cam 120/180 im Menschen (Damsky et al., 1983) und als Arc-1 im Hund (Imhof et al., 1983) beschrieben. Das humane E-Cadherin Gen ist auf Chromosom 16q22.1 lokalisiert (Takeichi, 1990), die kodierende Region besteht aus 2652 Basenpaaren.

Reduzierte Expression durch genetische Herabregulation oder ein gänzlicher Verlust des E-Cadherin führen zu einer reduzierten Aggregation der betreffenden Zellen, zu gesteigerter Motilität und Invasivität (Frixen et al., 1991; Handschuh et al., 1999; Handschuh et al., 2001). Eine erneute Expression von E-Cadherin kann die Invasivität wieder inhibieren (Vleminckx et al., 1991). In weiteren Studien wurde ebenfalls gezeigt, dass E-Cadherin als Invasionssuppressorgen (Efstathiou et al., 1999; Frixen et al., 1991) und als Tumorsuppressorgen in humanen Tumoren (Bex et al., 1995; Richards et al., 1999) fungiert. Es gibt Hinweise, dass genregulatorische Prozesse und/oder posttranslationale Mechanismen dabei eine Rolle spielen (Graff et al., 1995; Hennig et al., 1995). Eine direkte Korrelation zwischen dem Verlust von E-Cadherin einerseits und dem Differenzierungsgrad und Invasion

andererseits ist bei Schipper (Schipper et al., 1991) beschrieben. Als besonders aggressiv haben sich Magenkarzinome mit reduzierter E-Cadherin Expression bei jungen Patienten (<30 Jahre) herausgestellt (Lim et al., 2003). Veränderte Expressionsraten des E-Cadherins wurden auch bei Kolon- und Lungenkarzinomen beobachtet (El-Bahrawy et al., 2002; Qiu et al., 2002). Aber auch ein SNP (Single Nukleotide Polymorphismus), der häufigste Typ einer genetischen Variation (kommt etwa alle 1000 Basenpaare im 3 Milliarden Basenpaare umfassenden humanen Genom vor), wurde mit einer Herabregulierung von E-Cadherin beschrieben. So ist ein SNP an der Position 160 C/A beschrieben, der zu einer 68 prozentigen transkriptionellen Herabregulierung von E-Cadherin führt (Li et al., 2000). Eine mögliche kausale Assoziation dieses SNPs in Magenkarzinomen wird unter anderem in dieser Arbeit untersucht.

## 1.1 E-Cadherin Mutationen

Ein Verlust oder Mutationen im E-Cadherin Gen korrelieren oft mit der Metastasierung von epithelialen Tumoren (Birchmeier and Behrens, 1994). In vivo Mutationen im E-Cadherin Gen wurden in diffusen Magenkarzinomen (Becker et al., 1994; Becker et al., 1993; Berx et al., 1998b), in gynäkologischen Tumoren (Ovar und Endometrium) (Risinger et al., 1994) und im lobulären Brustkarzinom (Berox et al., 1995) entdeckt. Die Mutationen liegen über alle Exons verteilt, wobei eine Anhäufung der Mutationen in den Exons der extrazellulären Domäne zu finden ist. Die im diffusen Magenkarzinom beschriebenen Mutationen treten vor allem in den Exons 8 und 9 auf, welche auch als "Hot Spot" Region bezeichnet werden. Es handelt sich in erster Linie um „in frame“ Mutationen. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei in lobulären Mammakarzinomen identifizierten E-Cadherin Mutationen um "missense" oder "Stop"-Mutationen (Berox et al., 1995; Kanai et al., 1994). In gynäkologischen Tumoren treten vor allem "Missense"-Mutationen auf (Risinger et al., 1994). Somatische E-Cadherin Mutationen sind im diffusen Magenkarzinom durch verstreute Tumorzellmorphologie charakterisiert (Becker et al., 1994; Muta et al., 1996; Tamura et al., 1996). Weiterhin wurden auch Keimbahnmutationen im E-Cadherin Gen in Familien mit diffusen Magenkarzinomen beschrieben (Gayther et al., 1998; Guilford et al., 1999; Keller et al., 1999; Richards et al., 1999). E-Cadherin zeigt seine funktionelle Aktivität in der Anwesenheit mit Kalziumionen, die das E-Cadherin Molekül stabilisieren (Ozawa and Kemler, 1990; Pertz et al., 1999; Pokutta et al., 1994) und gegen Proteaseabbau schützen (Pertz et al., 1999). Das Entfernen von Kalziumionen führt zu dem Verlust der adhäsiven Eigenschaften und der Proteaseschutz ist aufgehoben (Takeichi, 1991). Die Kalziumionen fördern auch die Dimerisierung, so dass sich aus zwei E-Cadherin Molekülen *cis*-Dimere an der Kalziumbindeseite bilden (Takeda et al., 1999). Eine Stöchiometrie von ca. neun Kalziumionen je E-Cadherin Monomer wurde von Koch et al. (Koch et al., 1997) kalkuliert. Interessanterweise betreffen die meisten Mutationen beim diffusen Magenkarzinom die extrazellulären Domänen (ED) 2 und 3 (Becker et al., 1994; Muta et al., 1996; Tamura et al., 1996). Es wurde gezeigt, dass in ca. 50% der diffusen Magenkarzinome gehäuft „in frame“-Deletionen des Exons 8 (D8) oder des Exons 9 (D9) sowie Punktmutationen im E-Cadherin Gen vorlagen (Becker et al., 1994). Funktionelle Analysen (s.u.) zeigten, dass die tumorassoziierten Mutationen zu einer herabgesetzten Zelladhäsion, erhöhten Zellmotilität und veränderter Zellmorphologie führen (Handsuh et al., 1999; Handsuh et al., 2001). Die tumorassoziierte Mutation D370A (Exon 8) beeinflusst die Kalziumbindestelle mit dem Motiv DTND, die in der Linkerregion zwischen ED2 und ED3 lokalisiert ist. Ähnliche Motive sind in den weiteren Linkerregionen vorhanden (Abb. 1).

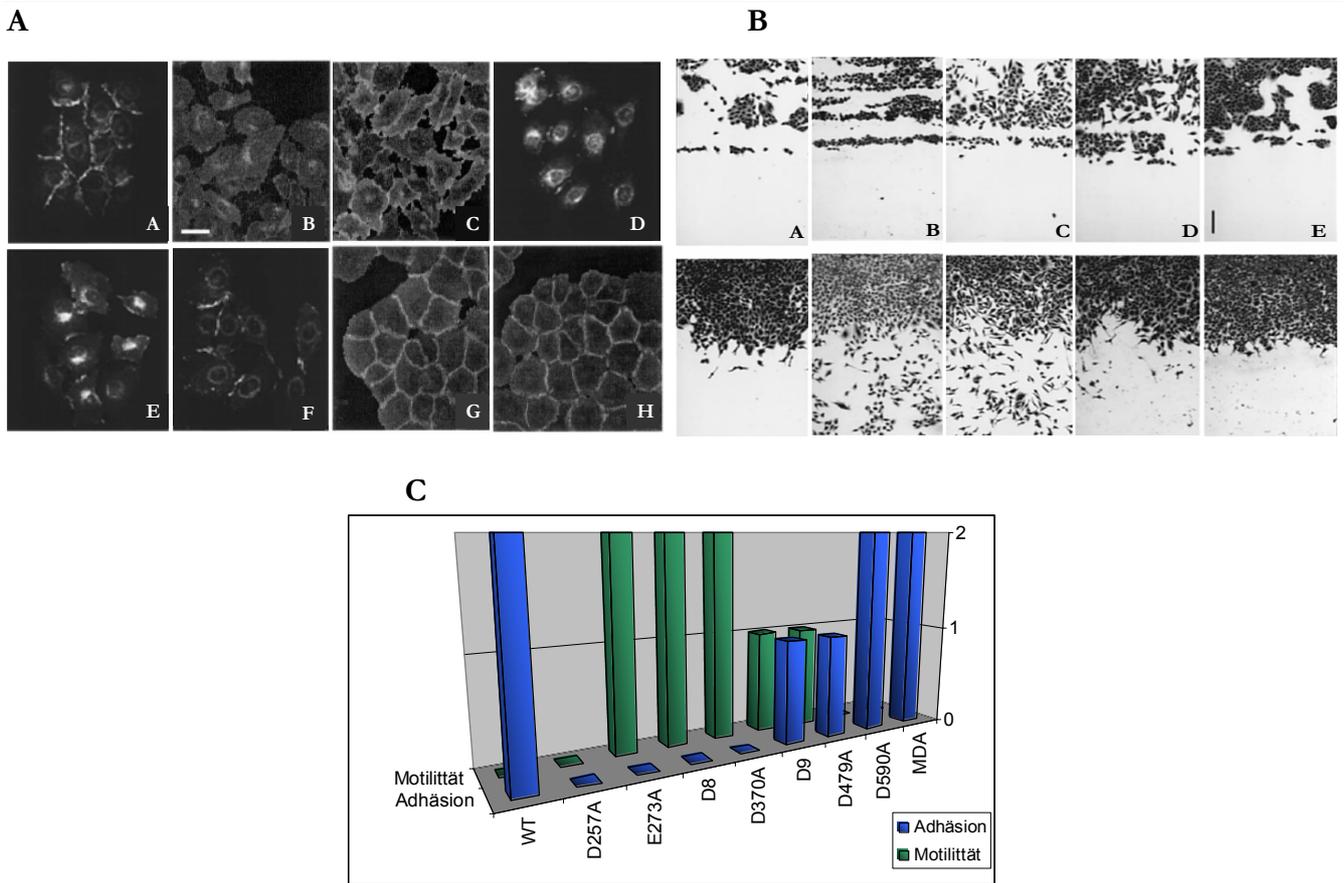


**Abb. 1: Schematische Darstellung der Exonstruktur der E-Cadherin cDNA mit häufigen Mutationen im diffusen Magenkarzinom und putativen Kalziumbindestellen in der kodierten extrazellulären Domäne.**

Dargestellt sind in dieser Abb. die 16 Exons, die fünf extrazellulären, die transmembrane und die zytoplasmatische Domänen und die Linkerregionen von E-Cadherin. Schraffiert markiert sind die Exon 8- und Exon 9-Deletionen. Die Mutationsstellen der putativen Kalziumbindestellen sind ebenfalls in der Abb. dargestellt (D257A, E273A, D370A, D479A, D590A). TM: Transmembran Domäne. Zyto: Zytoplasmatische Domäne. ED1-5: Extrazelluläre Domäne 1-5.

Um funktionelle Defekte in diesen Regionen zu untersuchen haben Handschuh et al (Handschuh et al., 2001) das putative Kalziumbindemotiv DXXD zu DXXA mutiert (Austausch von Asparaginsäure zu Alanin). So wurde die Sequenz DQND (erste Linkerregion), DVLD (dritte Linkerregion) und DVND (vierte Linkerregion) zu D257A, D479A und D590A verändert. Zusätzlich wurde noch das Motiv EGA, dass sich in der Nähe des Sequenzmotivs DQND in der ersten Linkerregion befindet, zu E273A mutiert und sämtliche Konstrukte stabil in MDA-MB-435S transfiziert. MDA-MB-435S Zellen sind für E-Cadherin Studien geeignet, da sie kein endogenes E-Cadherin besitzen. Während MDA-MB-435S Zellen bis vor kurzem als gängiges Mammakarzinom Modell etabliert war, stellen kürzliche Untersuchungen des Transkriptomts dieser Zellen dies in Frage (Ellison et al., 2002; Ross et al., 2000). Diese Arbeiten geben Hinweise darauf, dass die MDA-MB-435SZellen von einem okkulten Melanom und nicht vom Mammakarzinom der Patientin abgeleitet sein könnten. Allerdings hat dieser Sachverhalt keinen Einfluss auf die in vorliegender Arbeit durchgeführten Versuche.

Alle diese Zelllinien mit Ausnahme der Zellen mit dem Motiv D590A zeigten in unterschiedlichen Graduierungen veränderte Zellmorphologie, subzelluläre E-Cadherin-Lokalisation, kalziumabhängige Aggregation, Zellmotilität und Veränderungen im Aktin-Zytoskelett.



**Abb. 2: Immunofluoreszenzfärbung, Motilität und Adhäsion von MDA-MB-435S Zellen**

A: Gezeigt ist eine Immunofluoreszenzfärbung von MDA-MB-435S Zellen, die mit unterschiedlichen E-Cadherin Varianten transfiziert wurden. Der E-Cadherin spezifische monoklonale Antikörper HECD-1 wurde hierbei verwendet. Der Balken in B repräsentiert 25 µm. Die gestörte Zelladhäsion ist in den Abb. C, D, E und F ersichtlich. ((Handschuh et al., 1999; Handschuh et al., 2001)

A: WT; B: D257A; C: E273A; D: D8; E: D370A; F: D9; G: D479A; H: D590A

B: Diese Abb. zeigt einen Wundheilungstest. Zellen wurden aus der Zellschicht abgekratzt und der zellfreie Bereich 48 Stunden beobachtet. Anhand der eingewanderten Zellen kann die Motilität bestimmt werden. Die obere Reihe zeigt den Bereich direkt nach dem Abkratzen, die untere Reihe den Bereich nach 48 Stunden.

A: WT; B: D8; C: D370A; D: D9; E: MDA

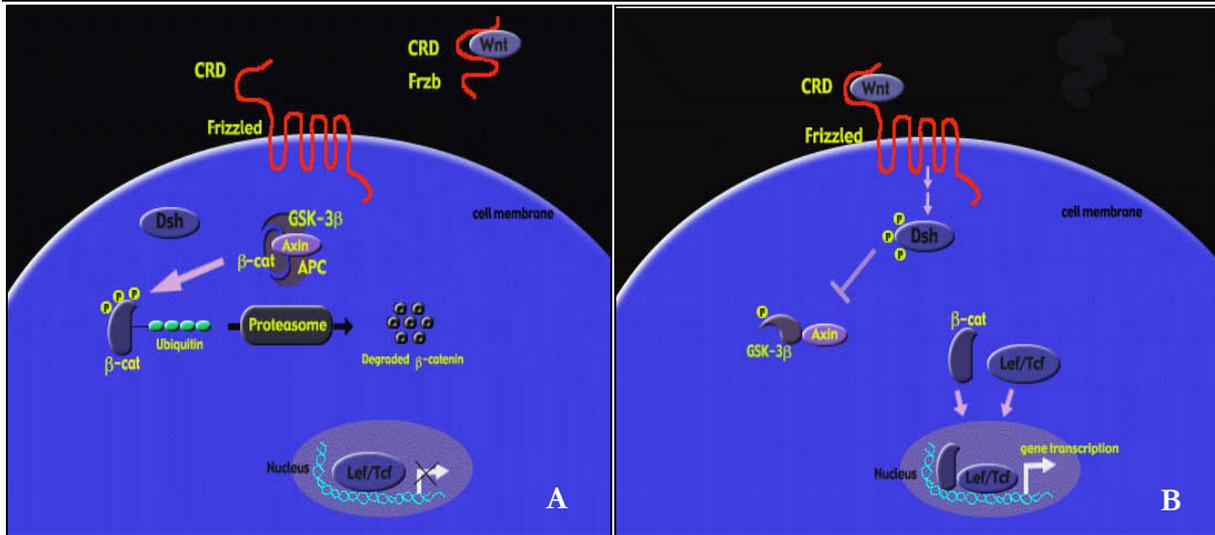
C: Das Diagramm fasst die adhäsiven und Motilitäts-Eigenschaften der Zelllinien zusammen. 0 bedeutet, dass die Zelllinie keine adhäsiven Eigenschaften hat bzw. nicht motil ist. Auffällig ist, dass Adhäsion und Motilität fast immer entgegengesetzt korrelieren. Schwach ausgeprägte Adhäsion hat eine erhöhte Motilität zur Folge und umgekehrt. Die Zelllinien D9 und D479A haben noch eine Restadhäsivität und zeigen nur leicht erhöhte Motilität. Einzige Ausnahme hierbei ist die Zelllinie D257A, die zwar ihre Adhäsion verloren hat, aber nicht motil ist.

Die D257A, D8 und D370A Zellen zeigen eine abnormale Anfärbung in der perinukleären Region. Nur ein geringer Teil der E-Cadherin Moleküle befindet sich an den Berührungsstellen des Zell-zu-Zellkontaktes. Im Gegensatz dazu befinden sich die E-Cadherin Moleküle bei den E273A Zellen in erster Linie an den Zell-zu-Zell-Kontaktstellen. Die Zellen D9, D479A und D590A haben eine E-Cadherin Verteilung, die der den WT Zellen gleicht. Die E-Cadherin Moleküle befinden sich dabei am lateralen Zell-zu-Zellkontakt und keinerlei Fluoreszenz war in den Regionen ohne Zellkontakt detektierbar. Einhergehend mit der E-Cadherin Lokalisation zeigen die Zellen unterschiedliche Motilitäts- und Adhäsionseigenschaften. Die Motilitätseigenschaften wurden bei den Zelllinie mittels eines Wundheilungstests bestimmt. Dazu wurden Zellen aus der Zellschicht abgekratzt und der zellfreie Bereich 48 Stunden beobachtet. Anhand der eingewanderten Zellen kann die Motilität der Zellen bestimmt werden. Nicht transfizierte MDAs sowie WT Zellen wanderten nicht in den zellfreien Raum. D9 und D479A Zellen zeigten im Vergleich zu WT eine leicht erhöhte Motilität. Im Gegensatz dazu wanderten Zelllinien mit einer Mutation in Exon 8 (D8 oder D370A) und E273A Zellen schnell in den zellfreien Raum (Abb. 2B). Um die Motilität objektiv zu

quantifizieren, wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die nach 48 Stunden in 1 cm<sup>2</sup> gewandert sind. Bei den MDA und WT Zellen waren es ca. 100 Zellen, bei D257A und D590A ca. 300 Zellen, bei D479A ca. 500 Zellen, bei D9 um die 1000 Zellen, bei E273A ca. 1500 Zellen und bei den Zellen mit einer Exon 8 Mutation (D8 und D370A) ca. 10.000 Zellen, die pro cm<sup>2</sup> gezählt wurden. Die Zelladhäsion, für die -wie schon zuvor beschrieben- Kalziumionen wichtig sind, wurde mittels Kalzium abhängiger Aggregation bestimmt. Die Zellen wurden mit und ohne den Kalziumchelator-Bildner EGTA in einem Schüttler inkubiert, die Aggregate gezählt und anschließend das Verhältnis von Zellen, die ohne EGTA behandelt wurden zu den Zellen, die mit EGTA behandelt wurden, bestimmt. Die Motilitäts- und Adhäsionsergebnisse aus den beiden Publikationen von Handschuh et al. (Handschuh et al., 1999; Handschuh et al., 2001) sind in Abb. 2C in Diagrammform dargestellt.

## 2 WNT-Signalweg

Bei Wnts (Wingless) handelt es sich um Regulatoren der Zellproliferation und -differenzierung. Das zentrale Protein des WNT-Signalwegs ist dabei  $\beta$ -Catenin, welches sowohl als Transkriptionskofaktor mit Tcf (T-cell factor)/Lef (Lymphoid-enhancer factor) im WNT-Signalweg als auch als Struktur Adapter zwischen E-Cadherin und dem Aktin Zytoskelett bei der Zelladhäsion fungiert. Wnts sind sezernierte, lipidmodifizierte Signalproteine, die in Organentwicklung, zellulärer Proliferation, Morphologie und Motilität eine wichtige Rolle spielen (Cadigan and Nusse, 1997; Dale, 1998; Miller et al., 1999). Es sind 19 WNT-Gene im Säugetiergenom bekannt. Freigesetzte Wnts binden an die Rezeptoren der Frizzled Familie, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind und in einem Komplex mit Lrp5/6 aktiv ist (Jones and Jomary, 2002). Frizzled aktiviert darauf hin das zytoplasmatische Protein Dsh (Dishevelled), welches die Aktivität der Gsk-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) inhibiert (Julius et al., 2000). Dadurch wird  $\beta$ -Catenin nicht durch die Gsk-3 $\beta$  phosphoryliert und dann abgebaut, sondern gelangt in den Zellkern, wo es als Kofaktor an Tcf/Lef bindet (Huber et al., 1996; Molenaar et al., 1996; Papkoff et al., 1996; Porfiri et al., 1997). Zusammen mit Tcf/Lef moduliert es die Transkription von Zielgenen wie CCND1 (Cyclin D1), MYC, JUN und weiteren Genen (Schwartz et al., 2003; Zhai et al., 2002). Falls keine Wnts sezerniert werden, wird freies  $\beta$ -Catenin von einem Komplex aus Gsk-3 $\beta$  (Rubinfeld et al., 1996), Apc (adenomatous polyposis coli) (Gumbiner, 1995; Rubinfeld et al., 1993; Su et al., 1993) und Axin (Behrens et al., 1998; Hart et al., 1998; Ikeda et al., 1998; Sakanaka et al., 1998) phosphoryliert und dann durch den „Ubiquitin Proteasom Signalweg“ degradiert (Aberle et al., 1997; Jiang and Struhl, 1998; Orford et al., 1997). Der WNT Signalweg wird aber noch von verschiedenen weiteren Faktoren reguliert. Wichtige Regulatoren sind die Gruppe der Sfrps (secreted frizzled related proteins). Sie können sowohl die Wnts außerhalb der Zelle kompetitiv abfangen, wodurch die Wnts nicht mehr an Frizzled binden können (Abb. 3).

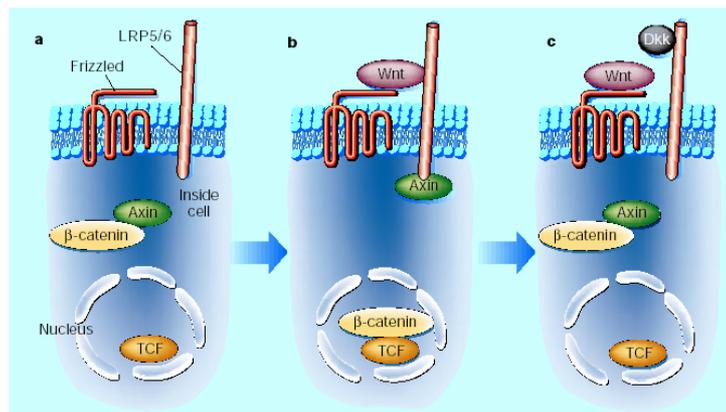


**Abb. 3.: WNT Signalweg**

- A: WNT Signalweg im Ruhezustand: Frzb fängt die WNTs ab, dadurch kommt es zu keiner Aktivierung von Dsh. Damit ist GSK-3β aktiv und β-Catenin wird phosphoryliert, ubiquitiniert und dann im Proteasom abgebaut.
- B: WNT Signalweg im aktiven Zustand: Wnts binden an Frizzled, Frizzled gibt das Signal an Dsh weiter. Dsh wird phosphoryliert und damit aktiv. Es hemmt Gsk-3β, wodurch β-Catenin nicht phosphoryliert und im Proteasom abgebaut wird, sondern sich im Zytoplasma anreichert und als Kofaktor für Tcf/Lef im Nukleus fungiert und bestimmte Gene exprimiert werden

CRD = cysteine-rich Domain  
 Frzb = frizzled-related protein (gehört in die Gruppe der SFRPs)  
<http://kinase.uhnres.utoronto.ca/pages/maps.html>

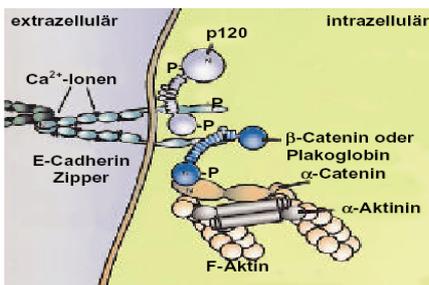
Damit das WNT Signal in die Zelle weitergeleitet wird, müssen die Wnts sowohl an Lrp5/6 als auch an Frizzled binden, um einen funktionellen Liganden Rezeptor Komplex zu bilden (Mao et al., 2001b; Pinson et al., 2000; Tamai et al., 2000; Wehrli et al., 2000). Eine Gruppe, die die Bildung dieses Komplexes inhibiert, sind die DKKs (Dickkopf). So bindet Dkk1 an Lrp5/6 und blockiert dabei die Interaktion zwischen Wnt-Frizzled und Lrp5/6, womit der WNT Signalweg unterbrochen ist und β-Catenin abgebaut wird (Mao et al., 2001a). Kürzlich wurde ein zweiter Mechanismus entdeckt, über den Dkk1 agiert. Die intrazelluläre Domäne von Lrp5/6 interagiert mit Axin (Mao et al., 2001b). Das WNT Signal stimuliert die Rekrutierung von Axin an Lrp5/6, wo das Axin dann degradiert wird. Dadurch ist der oben beschriebene Komplex aus Gsk-3β, Apc und Axin destabilisiert und β-Catenin wird nicht abgebaut und kann in den Zellkern gelangen (Abb. 4B). Durch die Bindung von Dkk1 an Lrp5/6 wird Axin nicht gebunden und abgebaut und kann somit im Komplex aus Gsk-3β, Apc und Axin β-Catenin abbauen (Abb. 4c).



**Abb. 4: Wirkmechanismus von Dkk**

- a: In der Abwesenheit von Wnt Proteinen befindet sich  $\beta$ -Catenin außerhalb des Zellkerns im Komplex mit verschiedenen Proteinen inklusive Axin.
- b: Das Wnt Protein bindet an beide Rezeptoren Frizzled und Lrp5/6, wodurch Axin zu der intrazellulären Domäne von Lrp5/6 rekrutiert und dann abgebaut wird.  $\beta$ -Catenin wird dadurch nicht mehr abgebaut, gelangt in den Zellkern und aktiviert die Genexpression mit Tcf/Lef.
- c: Dkk bindet an Lrp5/6 und verhindert die Interaktion des Wnt-Frizzled Komplexes mit Lrp5/6. Axin wird dadurch nicht an Lrp5/6 gebunden und kann im Komplex mit Gsk-3 $\beta$  und Apc  $\beta$ -Catenin abbauen.

Eine gestörte Regulation von  $\beta$ -Catenin führt unter anderem zu Darmkrebs, Melanoma, Prostatakrebs, Eierstockkrebs und einer Reihe weiterer Krebsarten.  $\beta$ -Catenin hat aber neben seiner Funktion im WNT Signalweg auch eine wichtige Funktion beim Zell-zu-Zellkontakt. Es interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin und verbindet E-Cadherin mit  $\alpha$ -Catenin. Mittels  $\alpha$ -Catenin ist der E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Komplex dann direkt mit dem Aktin Zytoskelett (F-Aktin und  $\alpha$ -Aktinin) verbunden (Yap et al., 1997).



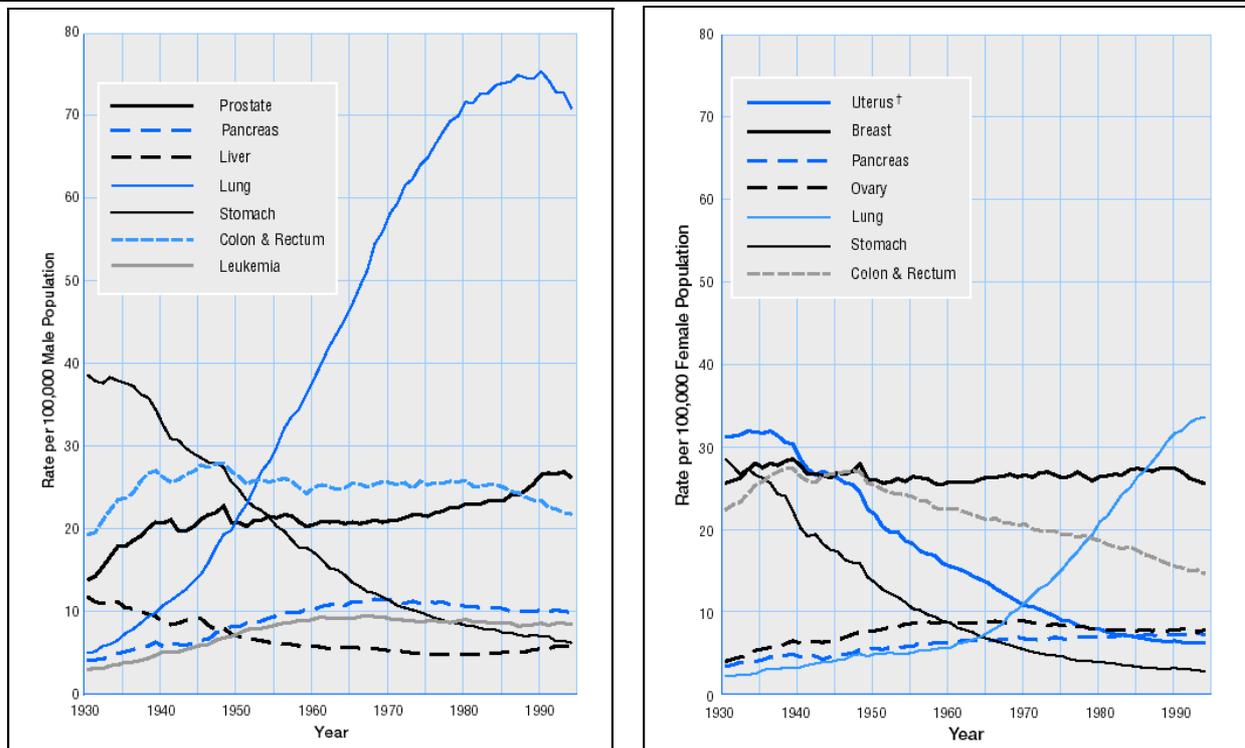
**Abb. 5: Schematischer Überblick über den E-Cadherin/Catenin Komplex an der Zytoplasmatischen Membran.**

Der N-Terminus von E-Cadherin Dimeren befindet sich im zwischenzellulären Raum, wo sie homophil an E-Cadherin Dimere der Nachbarzelle binden.  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen sind für die Ausbildung der korrekten Konformation und der Funktionalität der E-Cadherine essentiell. Der C-Terminus des E-Cadherin reicht in das Zytoplasma, wo es mit  $\beta$ -Catenin,  $\gamma$ -Catenin oder Plakoglobulin assoziiert ist.  $\beta$ -Catenin und Plakoglobulin sind mit  $\alpha$ -Catenin assoziiert, welches wiederum entweder direkt mit F-Aktin oder über  $\alpha$ -Aktinin Kontakt hat (Bexx et al., 1998a).

### 3 Das Magenkarzinom

#### 3.1 Allgemeines zum Magenkarzinom

Das Magenkarzinom war bis ca. 1950 in den meisten europäischen Ländern sowie in Nordamerika die häufigste Krebserkrankung. Seit 1941 hat in Nordamerika die Häufigkeit deutlich von fast 50 Todesfällen pro 100.000 Einwohner p.a. auf jährlich unter 10 Todesfälle je 100.000 Einwohner abgenommen (Abb. 6). Als Ursache für diese Abnahme werden Änderungen in den Ernährungsgewohnheiten vermutet. Genauer betrachtet kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Häufigkeit von Magenkrebskrankungen in verschiedenen Magenbereichen, dagegen aber gleichzeitig zu einer Zunahme im Kardiabereich. 1995 erkrankten in Deutschland jedoch immer noch etwa 19.800 Menschen an Magenkrebs. Die World Health Organisation (WHO) geht für das Jahr 1996 von etwa 1 Million Neuerkrankungsfällen aus. Dies entspricht ca. 10% aller Krebsneuerkrankungen auf der Welt (Becker and Korfmann, 1998).



**Abb. 6: Krebsstodesrate**

Dargestellt ist die Krebsstodesrate für Prostata, Pankreas, Leber, Lunge, Magen, Darmkrebs und Leukämie in der männlichen Bevölkerung und für Uterus, Brust, Pankreas, Eierstöcke, Lunge, Magen und Darmkrebs in der weiblichen Bevölkerung. Während 1930 in den USA Magenkrebs die Hauptkrebstodesursache war, ist es aktuell die siebthäufigste Krebstodesursache (American Cancer Society).

Der Häufigkeitsgipfel liegt jenseits des 50. Lebensjahres, jedoch treten immerhin ca. 10% der Magenkrebs-erkrankungen bei Patienten zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr auf. In Japan, wo Magenkarzinome immer noch die häufigste Krebsart sind, wurde das Risiko an Magenkrebs zu versterben durch die Gastroskopieuntersuchungen der Bevölkerung um 50% gesenkt (<http://www.onkologie.de>). In Deutschland erkranken doppelt so viele Männer wie Frauen an Magenkrebs, wobei beim Mann das Magenkarzinom der fünfthäufigste, bei der Frau der vierthäufigste bösartige Tumor in Deutschland ist (<http://www.krebs-kompass.de>, weiter Link zu Magenkrebs). Insgesamt erkranken 19.800 Menschen in Deutschland an Magenkrebs. Auch wenn die Zahl der Neuerkrankungen in den letzten beiden Jahrzehnten in Deutschland, wie auch in den anderen westlichen Industrieländern um ca. 50% sank, ist es wichtig die malignen Zellen zu charakterisieren und somit neue Ansätze zur Therapieentwicklung zu schaffen. Die Ursachen sind bisher zwar nicht eindeutig geklärt, jedoch ist eine Reihe von Risikofaktoren bekannt.

## 3.2 Mögliche Ursachen für die Entstehung eines Magenkarzinoms

### 3.2.1 Endogene Risikofaktoren (Risikosteigernde Erkrankungen)

Die meisten Magenkarzinome entstehen sporadisch und nur 8-10% sind erblich bedingt (La Vecchia et al., 1992). Das Risiko an Magenkrebs zu erkranken ist bei erblicher Belastung erhöht. So ist ein 3,7fach erhöhtes Risiko bei Erkrankung von Familienmitgliedern ersten Grades (Eltern, Kinder, Geschwister) bekannt. Familiäre Anhäufungen zeigen in 12-25% ein dominantes Vererbungsmuster (Goldgar et al., 1994; Jones, 1964). Die Entstehung von Magenkarzinomen tritt gelegentlich in Familien mit Keimbahnmutationen in den Genen TP53 (Li Fraumeni Syndrom) (Varley et al., 1995) und BRCA2 (Thorlacius et al., 1996)) auf. Keimbahnmutationen in dem Gen, das für das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin (CDH1) kodiert, führen zu einer autosomal dominanten Prädisposition für

ein Magenkarzinom, welches als vererbtes diffuses Magenkarzinom (HDGC) bezeichnet wird (Gayther et al., 1998; Guilford et al., 1999). Der Verlust der Heterozygotie (LOH = *loss of heterozygosity*) steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Tumorentstehung. Betroffen sind u.a. die Chromosomenregionen 3p, 4, 5q (30-40% auf dem APC-Lokus) und 17p (über 60% auf dem *TP53*-Lokus) (Rhyu et al., 1994; Sano et al., 1991). Auch Menschen mit der Blutgruppe A sind häufiger betroffen (Aird et al., 1953; Haenszel et al., 1976).

*Helicobacter pylori*, ein vor wenigen Jahren entdecktes und ubiquitär vorkommendes Bakterium, welches sich im Magen in der Schleimhaut einnistet und Gastritis verursacht, wird heute für über 90% der Magenfrühkarzinome in Deutschland verantwortlich gemacht. Das Risiko an einem Magenlymphom zu erkranken erhöht sich bei einer *H. pylori* Infektion um den Faktor 6. Eine kausale Verbindung zur Entstehung von Magengeschwüren, Magenkrebs und dem MALT (Mucous Membrane Associated Lymphoid Tissue) Lymphom gilt als gesichert (Go, 2002). 1996 wurde der Organismus von der World Health Organisation (WHO) als kanzerogen eingestuft (Parsonnet, 1996). Andererseits, trotz der Häufigkeit der *H. pylori* Infektionen erkranken nur wenige infizierte Personen im Laufe ihres Lebens an einem Magenkarzinom (ca. die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit *H. pylori* infiziert). Die vorbeugende (prophylaktische) Beseitigung von *H. pylori* Infektionen zur Vermeidung von Magenkrebskrankungen ist daher umstritten und bisher in ihrer Wirksamkeit nicht bewiesen. Bei chronisch atrophischer Autoimmungastritis (Typ A), bei einer lang anhaltenden Magenentzündung, 15 bis 20 Jahre nach einer Magenoperation, bei perniziöser Anämie, bei Vitamin B 12 Mangel, bei adenomatösen Magenpolypen sowie bei Morbus Ménétrier ist das Risiko einer Magenkrebskrankung ebenfalls deutlich erhöht. Untersuchungen konnten zeigen, dass ein Magenkrebs in Deutschland nur zu etwa 0,5% in einer gesunden Magenschleimhaut (Mukosa) entsteht (<http://www.onkologie.de>).

### 3.2.2 Exogene (Umwelt-) Risikofaktoren

Ernährungsfaktoren spielen ebenfalls für die Entstehung von Magenkarzinomen eine große Rolle. Während in den Ländern Japan, China, Chile, Finnland, Kolumbien und Venezuela besonders viele Einwohner an Magenkrebs erkranken, haben die Nachfahren von Japanern, die in die USA ausgewandert sind, kein erhöhtes Risiko mehr. Dies wird auf andere Ernährungsgewohnheiten zurückgeführt, d.h. das erhöhte Risiko in diesen Ländern an Magenkrebs zu erkranken ist nicht auf genetische Faktoren zurückzuführen. Folgende Faktoren spielen voraussichtlich für die Magenkrebsentstehung eine Rolle:

- Der hohe Nitratgehalt geräucherter und gesalzener Nahrung kann durch bakterielle oder zubereitungsbedingte (z.B. Braten oder Grillen) Umwandlung von Nitraten zu Nitriten und deren Verbindung mit Eiweiß zu krebserzeugenden Nitrosaminen das Magenkrebsrisiko steigern.
- Ein Mangel an Magensäure bei der so genannten Achlorhydrie begünstigt nitritbildende Bakterien. Das Nitrat aus nicht frisch verzehrtem Gemüse kann durch die nitritbildenden Bakterien zu den krebserzeugenden Nitrosaminen umgewandelt werden.
- Außer den Nitriten können über die Nahrung auch bestimmte Gifte von Schimmelpilzen, die Aflatoxine, die als Risikofaktoren in Verdacht stehen, aufgenommen werden.
- Rauchen gilt ebenfalls als Risikofaktor für Magenkrebs, da krebserregende Bestandteile des Tabakrauches mit dem Speichel gelöst werden und so in den Magen gelangen.

- Alkohol schädigt - besonders in konzentrierter Form - die Schleimhäute von Mund, Speiseröhre und Magen.
- Zu heiße Speisen gelten ebenso wie Eiweißmangel und Vitaminmangel durch einseitige Ernährung als magenschädigend.

### 3.3 Klassifizierung des Magenkarzinoms

Die Magenkarzinome werden wie auch andere Tumore durch das TNM-Schema charakterisiert. Es dient der international standardisierten Stadieneinteilung (Staging) einer Tumorkrankheit. Kriterien des TNM-Schemas sind Größe bzw. Ausdehnung des Primärtumors (T0, T1-T4), Lymphknotenbefall (N0-N3), sowie Metastasenstatus (M0, M1). Außer der TNM-Klassifikation wird beim Magenkrebs die Laurén-Klassifikation (Laur'En, 1965) angewendet, die eine besondere Bedeutung für das Ausmaß einer Operation hat. Die Laurén-Klassifikation unterscheidet:

**Interstinaler Typ:** Der Krebs wächst polypös (pilzförmig) in das Magenumen vor und ist gut begrenzt. Dieser Typ hat eine bessere Prognose als der diffuse Typ.

**Diffuse Typ:** Der Krebs wächst in der Magenwand und ist schlecht begrenzt. Die Prognose ist wegen früher Metastasierung ungünstig.

**Mischtyp:** Der Krebs wächst sowohl in Richtung Magenumen als auch seitwärts in der Magenwand vor. Es liegen neben diffus wachsende auch kompakt wachsende Anteile vor. Das klinische Verhalten entspricht den Karzinomen vom diffusen Typ.

Etwa 46% aller Magenkarzinome sind dem intestinalen und 36,5% dem diffusen Typ zuzurechnen. Der Mischtyp (15-20%) wird dem diffusen Typ zugeordnet. Während beim intestinalen Typ Ernährungsfaktoren für die Entstehung im Vordergrund stehen, werden für den diffusen Typ genetische Faktoren, z.B. E-Cadherin Mutationen verantwortlich gemacht. Diffuse Magenkarzinome weisen in 50% der Fälle Mutationen an Exon 8 oder Exon 9 des E-Cadherins auf (Becker et al., 1994). In diffus wachsenden Tumoren ist die homophile Zell zu Zell Adhäsion im Gegensatz zu intestinalen Tumoren stark herabgesetzt. Aus diesem Grund bieten gerade Magenkarzinome eine exzellente Möglichkeit Alterationen in Zelladhäsionsmolekülen zu untersuchen.

#### Histologie

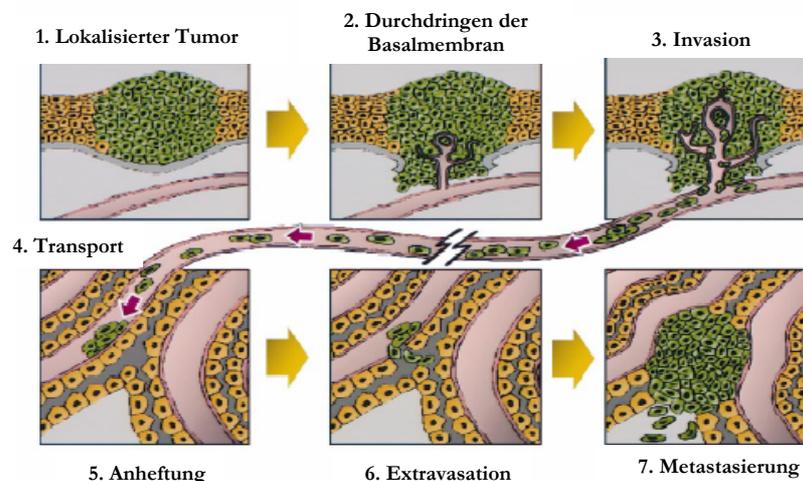
Die Einteilung der Tumorzellen erfolgt nach dem mikroskopischem Bild der Tumorzellen gemäß dem internationalen WHO-Schema in:

- Papilläres Adenokarzinom
- Tubuläres Adenokarzinom
- Muzinöses Adenokarzinom
- Siegelringzellkarzinom
- Adenosquamöses Karzinom
- Kleinzelliges Karzinom
- Undifferenziertes Karzinom

Zusätzlich wird der Differenzierungsgrad der Tumorzellen von G 1 = hoch differenziert (hohe Ähnlichkeit mit gesunden Körperzellen), über G 2 = mittel, G 3 = gering bis G 4 = undifferenziert angegeben. Eine Sonderstellung bei den bösartigen Tumoren des Magens nehmen die malignen Lymphome ein.

## 4 EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION

Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) ist eine Transformation, bei der sich die Zellen von ihrem ursprünglichen epithelialen Gewebe lösen und migrieren können ohne apoptotisch zu werden. Dabei erwerben epitheliale Zellen eine fibroblastenartige Morphologie verbunden mit dem gleichzeitigen Verlust von epithelialen Markern und dem Gewinn von mesenchymalen Markern. Auch haben die Zellen die Fähigkeit erworben extrazelluläre Matrix zu verdauen und durch sie hindurch zu migrieren (Hay, 1995). Aktuell wird der Begriff EMT immer öfter verwendet um die Veränderungen in den epithelialen Zellen hin zum invasiven Phänotyp zu beschreiben. In der Embryogenese, wo die zellulären Veränderungen exakt reguliert sind und insbesondere in der Morphogenese eine wichtige Rolle spielen, ist EMT essentiell. Das Epithel ist der erste exprimierte Gewebephänotyp im frühen Embryonalstadium. Während der Gastrulation wandern die primären mesenchymalen Zellen vom vegetativen Pol ins Blastocoel ein und differenzieren zu mesodermalen und endodermalen Epithel (EMT) (Hay, 1995). Erst Anfang der 90er Jahre wurde EMT als potentieller Mechanismus für die Karzinom Progression erkannt. Im Karzinom ermöglicht die EMT den Tumorzellen aggressiver zu sein und hat eine fundamentale Rolle bei den ersten Schritten der Invasion und der Metastasierung. Von Wyke et al. (Wyke, 2000) wurde ein Schema beschrieben, das die Metastasierung in sieben Schritten beschreibt. Der erste Schritt ist das Wachstum des Tumors einschließlich Angiogenese und die Aktivierung von Proteasen, gefolgt vom zweiten Schritt, der das Durchdringen der Basalmembran beschreibt. Charakteristisch dafür sind der verringerte Zellkontakt, erhöhte Sezernierung von Proteasen und erhöhte Zell zu Matrix Adhäsion. Dies ermöglicht den Tumorzellen sich fortzubewegen und in Gefäße einzudringen, das Hauptcharakteristikum für den dritten Schritt. Als nächstes erfolgt die Verteilung, wobei maligne Zellen zu entfernteren Orten über die Lymph- oder Blutbahn transportiert werden. Das Anheften und das Eindringen ins Gewebe sind die nächsten beiden Schritte. Es wird vermutet, dass die Zellen sich dann zurücktransformieren, da sie die Eigenschaften der sie umgebenden Zellen annehmen und wieder adhäsiv werden. Dieser Vorgang wird auch MET genannt (Mesenchymal-Epithelial Transition). Eine erhöhte Proliferationsrate ist das Hauptcharakteristikum im letzten Schritt, was zu einem Tumorwachstum an einem neuen Ort führt. Um all diese Schritte zu durchlaufen müssen die Tumorzellen ihr genetisches Programm modulieren (Even-Ram et al., 2001).



**Abb. 7: Stadien der Metastasierung**

Dargestellt sind die verschiedenen Stadien der Tumormetastasierung. Ein Primärtumor aus dem Oberflächenepithel bildet Lebermetastasen. Die sieben Schritte werden im Text beschrieben. (Wyke, 2000)

Auffällig ist auch die Tatsache, dass der Hauptteil der menschlichen Tumoren von Epithelzellen abstammt. Epithelzellen aus benignen Tumoren zeigen eine veränderte Zellpolarität, während es bei der Entwicklung zu undifferenzierten, malignen Tumoren aufgrund von EMT zu einer erhöhten Motilität kommt. In einigen Tumoren ist EMT transient und kommt nur in der Invasionsfront von primären Karzinomen vor. Der EMT Mechanismus wird nach der Etablierung von Metastasen wieder abgeschaltet (Brabletz et al., 1999). Durch die EMT kommt es zum Verlust von epithelialen und zur Neusynthese von mesenchymalen Markern. Einer der ersten Schritte ist dabei der Verlust der adhärenenten Verbindungen und Desmosomen. So ist während der EMT E-Cadherin herabreguliert oder aufgrund von Repressoren, die an den Promoterbereich von E-Cadherin binden, transkriptionell ausgeschaltet. Als potentielle Repressoren sind bisher Slug (Snai2), Twist, Sip1 (Zeb2), Snail, E12/E47 und Zeb1 bekannt (Nieto, 2002; Thiery, 2002). Die Transkriptionsfaktoren Snail, Snai3, E12/E47, Zeb1 und Sip1 binden an die E-Box Elemente im proximalen Promoterbereich des E-Cadherins und führen dabei zu einer transkriptionellen Inaktivierung des E-Cadherins. Für Snail konnte z.B. bewiesen werden, dass er bei unterschiedlichen murinen und humanen Karzinomen, Melanomzelllinien, Tumoren (Battle et al., 2000; Blanco et al., 2002; Cano et al., 2000; Cheng et al., 2001; Poser et al., 2001; Rosivatz et al., 2002; Yokoyama et al., 2001) und in der frühen Entwicklung von Drosophila und Maus (Carver et al., 2001; Nieto, 2002; Oda et al., 1998) E-Cadherin reprimiert. Für Slug, ein weiteres Mitglied der SNAIL-Familie (Hemavathy et al., 2000; Nieto, 2002), konnte kürzlich ebenfalls eine Rolle bei der E-Cadherin Repression gezeigt werden (Hajra et al., 2002). So ist Slug z.B. in den EMT-Regionen von Huhn und Xenopus Embryos exprimiert (Carl et al., 1999; del Barrio and Nieto, 2002; LaBonne and Bronner-Fraser, 2000; Nieto et al., 1994). Sip1 (Smad interacting protein 1) bindet an beide konservativen E2-Boxen vom minimalen E-Cadherin Promoter und reguliert damit Säugetier E-Cadherin herab. Sip1 und Snail binden an teilweise überlappende Promoter Sequenzen und zeigen einen ähnlichen E-Cadherin Herabregulationsmechanismus (Comijn et al., 2001). Twist ist während z.B. der Drosophila Embryogenese ein Aktivator von N-Cadherin (Oda et al., 1998) und agiert als Transkriptionsfaktor. Es wird vermutet, dass Twist in der EMT E-Cadherin reprimiert und N-Cadherin aktiviert (Kang and Massague, 2004). Alle diese Möglichkeiten, durch Repressoren das Expressionsprofil der Zellen zu verändern, geben dem Tumor die Möglichkeit schnell und effizient auf geänderte Umwelteinflüsse zu reagieren.

## 5 Wundheilung

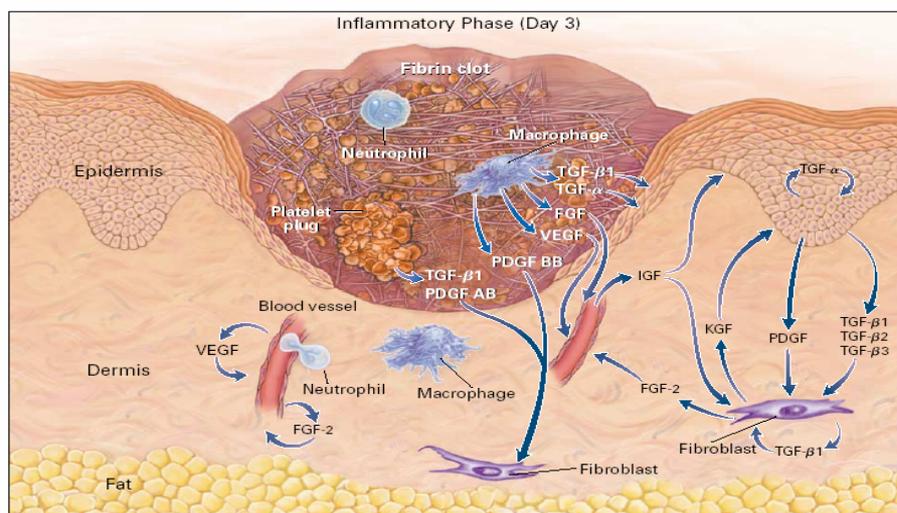
### 5.1 Allgemeines

Wundheilung ist eine komplexe und dynamische Kaskade von Ereignissen, die durch eine Verletzung verursacht wurde. Die Reaktion des Körpers auf eine Verletzung ist eine phylogenetisch primitive, und immer noch essentielle angeborene Wirtsimmunantwort für die Wiederherstellung der Gewebeintegrität (Martin, 1997; Singer and Clark, 1999). Der Prozess involviert koordinierte Zellaktivierung, Zellteilung, Angiogenese, Chemotaxis und Migration als auch die Differenzierung von mehreren Zelltypen. Er wird vermittelt durch die lokale Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die sowohl autokrin als auch parakrin wirken können. Alle Phasen der Wundheilung werden direkt oder indirekt durch Zytokine kontrolliert. Es ist in erster Linie die Balance der Zytokine

und anderen Mediatoren als die pure An- oder Abwesenheit von einem oder mehreren einzelnen Zytokinen, die die entscheidende Rolle in der Regulation der Initiierung, Progression und der Endphase spielt (Clark, 1996; Rappolee et al., 1988). Der Wundheilungsprozess besteht aus den drei Phasen Entzündung, Gewebeneubildung und Gewebe Remodelling, die sich zeitlich überlagern.

## 5.2 Entzündungsreaktion

Eine Gewebeerletzung verursacht eine Unterbrechung der Blutgefäße und damit das Auslaufen von Blutbestandteilen. Ein Blutgerinnsel, was sich daraufhin bildet, bewirkt eine Blutstillung und dient als provisorische extrazelluläre Matrix für Zellmigration. Die Blutplättchen ermöglichen aber nicht nur die Bildung des Blutgerinnsels, sondern sie sezernieren auch verschiedene Mediatoren wie den Pdgf (platelet-derived growth factor), der Makrophagen und Fibroblasten anlockt und aktiviert (Clark et al., 1996b). Monozyten werden durch Fragmente der extrazellulären Matrix, sowie Tgf $\beta$  und Mcp1 (monocyte chemoattractant protein 1) angezogen, infiltrieren den verwundeten Bereich und reifen zu aktivierten Makrophagen. Sie sezernieren Wachstumsfaktoren wie Vegf (vascular endothelial growth factor) und Pdgf, welche die Bildung eines granulotären Gewebes einleiten. Die Makrophagen binden durch ihre Integrinrezeptoren an bestimmte Proteine der extrazellulären Matrix, was ein Signal zur Phagozytose von Mikroorganismen und der extrazellulären Matrix ist (Brown, 1995). Des Weiteren sezernieren sie eine Reihe von inflammatorischen Zytokinen wie Tgf $\alpha$ , Tgf $\beta$ , Interleukin 1, Igf1 (insulin like growth factor I) und Csf1 (colony-stimulating factor 1) (Rappolee et al., 1988), die notwendig zur Einleitung der Wundheilung sind. So besitzen z.B. makrophagenarme Tiere eine defekte Wundheilung (Leibovich and Ross, 1975).



**Abb. 8: Kutane Wunde drei Tage nach einer Verletzung**

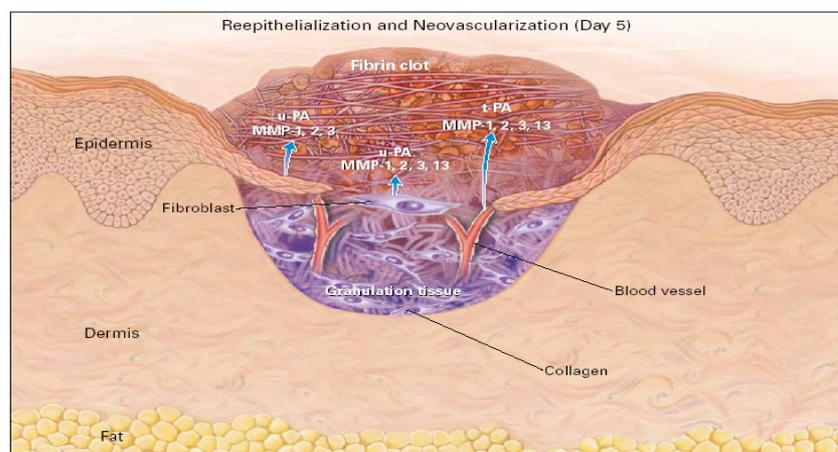
Die Wachstumsfaktoren, die notwendig für gerichtete Zellbewegungen in der Wunde sind, sind hier dargestellt (nach Singer and Clark, 1999).

Tgf- $\beta$ 1, Tgf- $\beta$ 2 und Tgf- $\beta$ 3: transforming growth factor  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, und  $\beta$ 3; Tgf- $\alpha$ : transforming growth factor  $\alpha$ ; Fgf: fibroblast growth factor; Vegf: vascularendothelial growth factor; Pdgf, Pdgf AB, und Pdgf BB: platelet-derived growth factor, platelet-derived growth factor AB und platelet-derived growth factor BB; Igf: insulin-like growth factor; Kgf: keratinocyte growth factor

### 5.3 Epithelialisierung

Die Reepithelialisierung der Wunde beginnt innerhalb weniger Stunden nach der Verletzung. Epidermale Zellen von Hautfortsätzen entfernen geronnenes Blut und verletzte Stroma aus der Wunde. Währenddessen zeigen die epidermalen Zellen eine phänotypische Veränderung wie die Auflösung der interzellulären Desmosomen und die Formierung von zytoplasmatischen Aktinfilamenten, die eine Zellbewegung ermöglichen (Gabbiani et al., 1978; Goliger and Paul, 1995). Des Weiteren adhären epidermale und dermale Zellen nicht mehr aneinander, was den Epidermiszellen eine laterale Bewegung ermöglicht. Die Expression von Integrinrezeptoren ermöglicht es ihnen mit einer Vielzahl von extrazellulären Matrixproteinen zu interagieren (z.B. Fibronektin oder Vitronektin), die sich zusammen mit Kollagen am Rand der Wunde befinden und verflochten sind mit dem Blutgerinnsel im Wundraum (Clark, 1990; Clark et al., 1996a; Larjava et al., 1993). Die migrierenden, epidermalen Zellen wandern in die Wunde und trennen den vertrockneten Grind vom lebenden Gewebe. Diese Trennung scheint durch die Anordnung der Integrine verursacht zu werden, die die migrierenden, epidermalen Zellen auf ihren Zelloberflächen exprimieren. Die Degradation der extrazellulären Matrix, die die epidermalen Zellen benötigen um zwischen der kollagenhaltigen Dermis und dem Grind zu wandern, hängt sowohl von der Produktion von Kollagenasen (Pilcher et al., 1997) als auch der Aktivierung von Plasmin durch den Plasminogenaktivator ab, der von den epidermalen Zellen produziert wird (Bugge et al., 1996). Der Plasminogenaktivator aktiviert Kollagenasen wie die Matrixmetalloproteinasen (Bobik and Tkachuk, 2003) und ermöglicht damit die Degradation von Kollagen und extrazellulären Matrixproteinen.

Ein bis zwei Tage nach der Verletzung proliferieren die epidermalen Zellen am Wundrand. Der fehlende Zellkontakt zu Nachbarzellen am Wundrand ist vermutlich das Signal sowohl zur Migration als auch zur Proliferation der epidermalen Zellen. Die lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren und die erhöhte Expression von Wachstumsfaktor Rezeptoren könnten diesen Prozess ebenfalls stimulieren (Clark et al., 1996b; Werner et al., 1994). Nachdem die Reepithelialisierung erfolgt ist, werden Basalmembranproteine vom Wundenrand zum Wundenmittelpunkt gebildet (Clark et al., 1982). Die Epithelzellen wandern so lange zur Wundoberfläche, bis sie Kontakt zu anderen Epithelzellen erhalten (Kontakthemmung). Die epidermalen Zellen kehren dann zu ihrem normalen Phänotyp zurück und sind wieder fest an der wiederhergestellten Basismembran und der darunter liegenden Dermis adhären.



**Abb. 9: Kutane Wunde fünf Tage nach einer Verletzung**

Blutgefäße sprießen in den Grind (Fibrin Clot) und epidermale Zellen wandern vom Wundrand in die Wunde ein. Matrix Metalloproteinasen sind für die Motilität der Zellen essentiell (nach Singer and Clark, 1999). Erklärung siehe Text.

u-PA: urokinase-type Plasminogen Aktivator; Mmp-1, 2, 3 und 13: Matrix Metalloproteinasen 1, 2, 3 und 13; t-PA: Tissue Plasminogen Aktivator.

## 5.4 Bildung von granulozytärem Gewebe

Das neue Stroma, auch Granulationsgewebe genannt, wächst ca. vier Tage nach der Verletzung in den Wundraum ein. Das neue Stroma beherbergt viele neu gebildete Kapillaren, Makrophagen, Fibroblasten und Blutgefäße. Die Makrophagen sezernieren kontinuierlich Wachstumsfaktoren, die die Fibroplasie (Fibroblasten wandern in die Wunde ein, die Zellbewegung wird dabei durch Kontaktführung gesteuert und endet bei Berührung mit gleichartigen Zellen) und Angiogenese stimulieren. Die Fibroblasten produzieren wiederum die neue extrazelluläre Matrix, die für das Hineinwandern der Zellen wichtig ist. Die Fibroblasten sind auch für die Neusynthese und das Remodelling der extrazellulären Matrix verantwortlich und umgekehrt kann die extrazelluläre Matrix, je nach Zusammensetzung, einen positiven oder negativen Effekt auf die Fähigkeit der Fibroblasten zum Remodelling und zur Neusynthese der extrazellulären Matrix haben. Nach dem Einwandern in die Wunde beginnen die Fibroblasten mit der Synthese der extrazellulären Matrix, wodurch die provisorische extrazelluläre Matrix durch eine Kollagenmatrix ersetzt wird (Clark et al., 1995; Welch et al., 1990). Nachdem die Kollagenmatrix gebildet wurde, hören die Fibroblasten auf Kollagen zu produzieren und die Zellen in der Wunde begehen Apoptose.

## 5.5 Neovaskularisation

Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der sowohl die extrazelluläre Matrix im Wundbett als auch migratorische und mitogene Stimulation von Endothelzellen benötigt (Yang et al., 2003). Die Induktion der Angiogenese erfolgt durch VEGF, VEGFC, Angiogenin, Angiotropin, CYR61, Thrombospondin und viele weitere Moleküle (Brigstock, 2003; Distler et al., 2003; Harry and Paleolog, 2003) als auch durch niedrigen Sauerstoffgehalt oder erhöhten Milchsäureanteil (Detmar et al., 1997). Die Verletzung verursacht die Zerstörung des Gewebes und eine Hypoxie. Die Produktion von Vegf, Vegfc und Cyr61 wird durch die Hypoxie in epidermalen Zellen stimuliert (Gollmer et al., 2000; Kunz et al., 2003) und proteolytische Enzyme werden freigesetzt und degradieren die extrazelluläre Matrix. Die Fragmentation der Basalmembran ermöglicht Endothelzellen, die durch Angiogenesefaktoren stimuliert sind, zu migrieren und neue Blutgefäße zu bilden. Sobald die Wunde mit neuem granulozytärem Gewebe aufgefüllt ist, stoppt die Angiogenese und viele der nicht mehr benötigten Blutgefäße gehen in Apoptose.

## 5.6 Weitere wundheilungsrelevante Faktoren

### 5.6.1 Matrix Metalloproteinasen

Die Balance von perzellulären Proteasen ist in der Wundheilung essentiell. Die wahrscheinlich wichtigsten Prozesse, die zum Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix führen, werden durch die Gruppe der Matrixmetalloproteinasen vermittelt (Ravanti and Kahari, 2000). Diese ständig wachsende Gruppe umfasst zurzeit mehr als 20 Enzyme. Die MMP-Familie kann dabei in fünf Untergruppen unterteilt werden: die Kollagenasen, die Stromelysine, die Gelatinasen, die Matrilysine und die Membrantyp (MT) Mmps. Dieses Klassifikationssystem basiert auf der Substratspezifität der Mmps. Mmps erleichtern den Zellen die Migration durch den Abbau der extrazellulären

Matrix. Sie sind essentiell für die Embryonalentwicklung, Morphogenese, Fortpflanzung und den Gewebeab- und umbau (Luttun et al., 2000; Werb and Chin, 1998). Die proteolytischen Aktivitäten der Mmps werden durch ihre Vorläufer, endogene Inhibitoren,  $\alpha$ -Macroglobuline und Timps (tissue inhibitors of metalloproteinases) kontrolliert. Timps (21–30 kDa) sind die wichtigsten endogenen Regulatoren der Mmp-Aktivitäten im Gewebe (Chang and Werb, 2001; Curran and Murray, 2000; Sternlicht and Werb, 2001). Die Überexpression von Mmps führt zu einer Störung der Balance zwischen Mmps und Timps, wodurch die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix proteolytisch degradiert werden. Dies ereignet sich sowohl in den frühen als auch in den späten Stadien der Tumorprogression, insbesondere während des Tumorwachstums, der Invasion, der Angiogenese und der Metastasenbildung (Chambers and Matrisian, 1997; Curran and Murray, 1999; Egeblad and Werb, 2002; Nawrocki et al., 1997; Okada et al., 1995). Mmp3 und Mmp7 können die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin schneiden und damit E-Cadherin inaktivieren (Davies et al., 2001; Lochter et al., 1997; Noe et al., 2001; Ryniers et al., 2002). Die dadurch entstandenen ektodermalen Fragmente des E-Cadherins fördern die Zellinvasion durch Interferenzen mit der E-Cadherin Funktion (Noe et al., 2001; Ryniers et al., 2002). Mmps werden in der Regel als Zymogene sezerniert und extrazellulär durch verschiedene Proteinase aktiviert. In vitro aktiviert Plasmin direkt proMmp1, proMmp3, proMmp9, proMmp10 und proMmp13 (Okada et al., 1992; Suzuki et al., 1990). Plasmin wird wiederum durch die Enzyme tPA (tissue type Plasminogen Activator) oder uPA (urokinase type Plasminogen Activator) aus Plasminogen umgewandelt und aktiviert. Plasmin degradiert auch Fibrin in lösliche Degradationsprodukte.

### 5.6.2 Angiogenese Faktor CYR61

Eine weitere grundsätzliche fundamentale Voraussetzung für Tumorwachstum, Invasion und der Metastase ist die Angiogenese. Cyr61 gehört zu den Angiogenesefaktoren. Es ist ein extrazelluläres, Matrix assoziiertes Heparinbindeprotein aus der CCN-Familie. Es ist auch beschrieben worden, dass Cyr61 als Regulator für verschiedene Gene, die in der Wundheilung eine große Rolle spielen, wie VEGF-A und VEGF-C (Angiogenese und Lymphogenese), IL-1b $\beta$  (Inflammation), MMP1, MMP3, TIMP1, uPA und PAI-1 (extrazelluläres Matrix Remodelling) und Col1 $\alpha$ 1, Col1 $\alpha$ 2, und Integrine  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 5 (Zell-Matrix Interaktionen), fungiert (Chen et al., 2001b). Cyr61 spielt auch eine Rolle in der Zelladhäsion, Migration und Proliferation (Chen et al., 2000; Grzeszkiewicz et al., 2001). Eine Überexpression von Cyr61 in Tumorzellen erhöht deren Tumorigenität und führt zu größeren Tumoren und einer stärkeren Vaskularisierung in immundefizienten Mäusen (Babic et al., 1998; Xie et al., 2001). Die Cyr61 Expression ist essentiell für die normale Entwicklung von Embryos. So führte das Zerstören des CYR61 Gens in Mäusen zur embryonalen Letalität. CYR61-Null-Embryos zeigen vaskuläre Defekte, was ebenfalls auf eine essentielle Rolle dieses Gens bei der embryonalen Angiogenese hinweist.

### 5.6.3 SPARC

Sparc (secreted protein acidic and rich in cysteine) ist ein extrazelluläres Glykoprotein, das in erhöhten Mengen in aktiv proliferierenden Zellen in der Embryonalentwicklung, in der Wundheilung, Tumorigenese und Angiogenese exprimiert wird (Lane and Sage, 1994; Rempel et al., 1999; Sage, 1997; Vial and Castellazzi, 2000). Sparc kann die Expression von MMPs in verschiedenen Zelltypen, die in die Wundheilung involviert sind, beeinflussen, wie z.B. Fibroblasten und Monozyten (Shankavaram et al., 1997; Tremble et al., 1993). Sparc moduliert die Zellform (Lane

and Sage, 1994; Sage, 1997) und die Zelladhäsion (Ledda et al., 1997; Rosenblatt et al., 1997; Sage, 1997), reguliert die Zellproliferation (Lane and Sage, 1994; Sage, 1997) und die Migration (Hasselaar and Sage, 1992; Huynh et al., 1999). Es ist auch bekannt, dass Sparc bestimmte Wachstumsfaktoren binden kann (Raines et al., 1992) und die Expression von ECM-Komponenten beeinflusst (Kamihagi et al., 1994). Viele dieser Funktionen sind auch in der Wundheilung relevant. Höhere Expression von Sparc-Protein und -mRNA kann während der Hautwundheilung detektiert werden, und zwar bereits kurz nach dem Auftreten der Verletzung, obwohl das höchste Expressionslevel erst gegen Ende der Wundheilung bei dem Geweberemodelling vorhanden ist (Hunzelmann et al., 1998; Reed et al., 1993).

## 6 Mikroarray

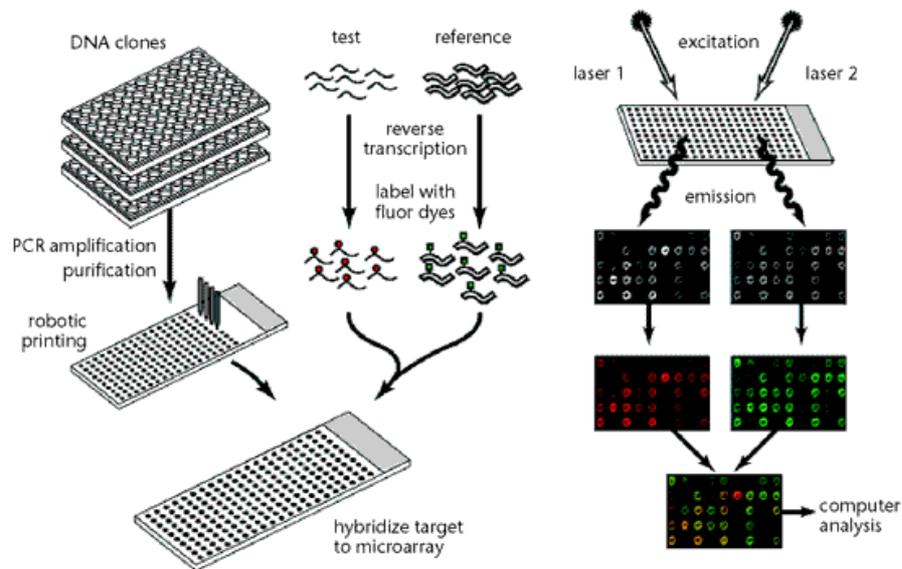
### 6.1 Allgemeines zu Mikroarrays

Es ist bekannt, dass mehrere zehntausend Gene und ihren Produkte in einem lebenden Organismus die Grundlage für das Geheimnis des Lebens sind. Traditionelle Methoden dies zu untersuchen arbeiten auf der Basis "ein Gen – ein Experiment", wie z.B. Northern Blot Analysen oder quantitative realtime RT PCR, wobei der Durchsatz sehr limitiert ist und ein „Gesamtbild“ von Genfunktionen schwer zu erreichen ist. In den vergangenen Jahren hat die Technik der Mikroarrays in immer mehr Labors Einzug gehalten. Die DNA Mikroarray Technologie kombiniert dabei das Hybridisierungsprinzip von Northern Blots mit der PCR basierenden RNA Markierung. Das Prinzip der Mikroarray Technologie wurde schon früher in Blotting und Filtertechniken verwendet (Augenlicht et al., 1987; Southern, 2000). Für ein Gen spezifische DNA Fragmente oder Oligonukleotide werden auf zwei- (z.B. beschichtete mikroskopische Glasoberfläche) oder dreidimensionale (poröse Membran) Oberflächen immobilisiert und die zu analysierende RNA wird während der reversen Transkription durch die Inkooperation von fluoreszenz- oder radioaktivgekoppelten Nukleotiden markiert. Während der Hybridisierung können die markierten RNA Produkte mit ihren inversen komplementären Sonden auf den Mikroarray hybridisieren und nach einer Serie von Waschschritten mit zunehmender Stringenz werden die Mikroarrays gescannt. Das radioaktiv- oder fluoreszenz-basierende Signal ermöglicht die Quantifizierung der relativen mRNA Menge für jedes Gen. Durch die Mikroarray Technologie können mehrere Tausend Gene (bis hin zum gesamten Genom eines Organismus) gleichzeitig auf einen einzigen Chip gescreent werden. Sie ermöglicht zudem den Vergleich von Genexpressionsmengen aus unterschiedlichen Proben wie z.B. aus normalen versus kranken Geweben, im Zeitverlauf von medikamentös behandelten versus nicht behandelten Organen, unterschiedliche Stadien der Differenzierung oder der Entwicklung. Schena und seine Gruppe (Schena et al., 1995) waren die ersten, die Mikroarray Analysen beschrieben haben. Es wurde hierbei die gleichzeitige Bestimmung der Genexpression von 45 Arabidopsis Genen beschrieben. In den nächsten zwei Jahren wurde Mikroarray Applikationen in vielen Organismen beschrieben, wie z.B. in Pflanzen (Schena, 1996), in Hefe (DeRisi et al., 1997) und in Menschen (DeRisi et al., 1996). Heller (Heller et al., 1997) konnte zeigen, dass Mikroarrays zur Klassifizierung von Krankheiten sowie der Identifizierung von krankheitsrelevanten Genen geeignet sind. Sogar in Forschungsbereichen, in denen die Genomsequenz nur partiell bekannt ist, wurden bereits Mikroarrays eingesetzt. So beschrieb Hayward (Hayward et al., 2000) die Konstruktion

eines „shotgun“ DNA Mikroarrays aus „Zufallsinserts“ aus einer Genombibliothek von *Plasmodium falciparum*. Mikroarrays haben auch ein großes Potential für die Diagnose. Alizadeh (Alizadeh et al., 2000) konnten B-Zell Tumore mittels ihres Genexpressionsprofils klassifizieren. Golub (Golub et al., 1999) verwendete das durch Mikroarrays gewonnene Genexpressionsprofil, um zwischen akuter myeloiden Leukämie und akuter lymphatischer Leukämie zu unterscheiden. Die Entwicklung eines Mikroarrays, um Neugeborene gleichzeitig auf Sichelzellanämie,  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Defizienz und Faktor V Leiden zu untersuchen, wurde von Neo Gen Screening (Dobrowolski et al., 1999) beschrieben. Weitere Analysen der Mikroarray Daten ermöglichen die Klassifizierung von bekannten und noch unbekannt Genen anhand ihres Expressionsmusters. Globale Genexpressionsprofile in Zellen oder Geweben geben Aufschluss über die molekulare Basis des Phänotyps, die Pathologie oder die Wirkung von Behandlungen. Eine vergleichsweise preiswerte Biochiptechnologie ist die cDNA-Mikroarray Technik. Bei dieser Technologie handelt es sich um eine kompetitive Technik zwischen rot fluoreszierender Cy5 markierter cDNA und grün fluoreszierender Cy3 markierter cDNA. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Hybridisierung mit Nylonmembranen oder Genchips von Affymetrix um eine nicht kompetitive Technik. Hierbei wird jede Probe separat auf einem Chips hybridisiert und absolute Expressionswerte bestimmt, während bei den cDNA Mikroarrays sowohl absolute und insbesondere auch relative Expressionswerte bestimmt werden.

## 6.2 Herstellung von Mikroarrays

Die Herstellung von cDNA Mikroarrays beruht auf cDNA Klonen, die repräsentativ für ein Gencluster sind. Diese werden als Bakterienkulturen im Mehrwell Format von lizenzierten Anbietern wie dem IMAGE Konsortium angeboten und von Anbietern wie „ResGen Invitrogen Corporation“ oder dem „Resource Center of the German Human Genome Project (RZPD)“ vertrieben. Der Nachteil hierbei ist, dass viele der Klone eine Kontamination mit T1-Phagen zeigen, eine Mischpopulation aus mehreren Klonen oder eine falsche Sequenz enthalten (Halgren et al., 2001). Die Sonden für die Mikroarray Herstellung werden in der Regel durch Hochdurchsatz-PCRs im Mehrwell-Format aus den cDNA Klonen amplifiziert. Die Länge der immobilisierten cDNA Sonden bestimmen dabei die Kinetik des Hybridisierungsprozesses (Stillman and Tonkinson, 2001). Mittlerweile werden nur noch selten aufgereinigten Plasmide aus den Klonen auf die Mikroarrays gespottet (Bowtell and Sambrook, 2002b). Während in der Anfangsphase der Mikroarrays einige hundert Sonden auf einen Chip gespottet wurden, werden mittlerweile von den meisten Labors weit über 1000 Sonden auf einen Chip gebracht. In der Regel steigt dabei der Kostenaufwand für die Herstellung eines Mikroarray mit einem Vielfachen der zuletzt verwendeten Sonden nicht proportional mit der Anzahl der Sonden, sondern die Kosten je Sonde werden deutlich geringer. Hingegen ist der logistische Aufwand für eine fehlerfreie Klonpräparation, Klonaufbewahrung, Sondenamplifikation und das Spotten deutlich höher, das Qualitätsmanagement ist nur noch schwer zu bewerkstelligen und der Personalaufwand ist sehr hoch.



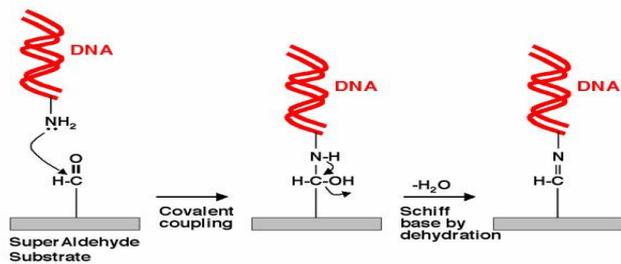
**Abb. 10: Mikroarray Herstellung und Hybridisierung**

cDNA Sonden werden mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt. Anschließend werden sie durch einen Computer gesteuerten Roboter auf beschichtete Objektträger gespottet. Die RNA von Referenz- und Testprobe werden revers transkribiert und dabei entweder mit Cy3 oder Cy5 markiert. Die markierten Proben werden dann zusammengeführt und unter stringenten Bedingungen mit dem Mikroarray hybridisiert. Mittels Laser werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und die Emission gemessen. Die monochromen Bilder vom Scanner werden in geeignete Software importiert und die Bilder pseudofärbt. Anschließend erfolgt die Auswertung der Bilder (Gridlegung, Zuordnung der Gennamen, Bestimmung der Verhältnisse, Normalisierung, Konfidenzintervalle, etc.).

Aus diesem Grund geht der Trend bei Mikroarrays mit einer großen Anzahl von Sonden immer mehr hin zu Oligonukleotid-Sonden. Die Kosten für die Oligonukleotid Massenproduktion sind in den letzten Jahren deutlich gesunken, weswegen auch die Kosten für Oligonukleotid Mikroarrays verglichen mit cDNA Mikroarrays mittlerweile geringer sind. Zusätzlich können die schnell wachsenden Sequenzinformationen sofort für die Synthese neuer Oligonukleotide genutzt werden. Seit einiger Zeit haben sich „Longmers“, Oligonukleotide mit Längen von ca. 40-70 bp bei den Mikroarrays durchgesetzt. Das „Design“ und die Auswahl der richtigen Sequenzen (z.B. Sondenlänge, GC-Gehalt, keine Überlappung mit anderen Gensequenzen, Lokalisation der Sonde auf dem Gen) ist eine kompliziert Prozedur (Religio et al., 2002; Rouillard et al., 2002), weswegen in der Praxis kommerziell erhältliche Oligonukleotide verwendet werden. Diese können dann direkt auf die Mikroarrays gespottet werden oder schon immobilisiert auf Glasoberflächen bezogen werden. Da in der Regel die reverse Transkription von eukaryontischen Proben mittels Oligo (dT) Primern durchgeführt wird, werden die Sonden meist 3'endig „designt“. Insbesondere der 3'untranslatierte Bereich verspricht eine hohe Spezifität bei einer gleichzeitig geringen Kreuzreaktivität. Für das Spotten der Sonden werden in der Regel Glasobjektträger verwendet. Die Vorteile von Glasmikroarrays sind die geringe Eigenfluoreszenz, die Transparenz, der günstige Preis, die Widerstandsfähigkeit gegen hohe Temperaturen, die physikalische Rigidität und eine Vielfalt von chemischen Modifizierungsmöglichkeiten. Die nicht poröse Natur des Glases hat z.B. gegenüber Membranen den Vorteil, dass die Proben direkten Zugang zu den Sonden haben und verringert den Hintergrund. In der Regel werden heute Mikroskopierobjektträger verwendet, die mit Aldehyden oder Poly-L-Lysin chemisch modifiziert sind (Schna et al., 1996). Um die Sonden auf die mit Aldehyden oder Poly-L-Lysin beschichteten Glasoberflächen zu bringen, werden Roboter (Spotter) verwendet, die mit Hilfe eines Pin-Ring Systems oder InkJet-Systemen die Sonden auf die Glasoberfläche bringen. Der Vorteil des Pin/Ring-Systems ist die Möglichkeit, Lösungen mit verschiedenen Viskositäten (cDNAs, Oligonukleotide, Peptide und

Antikörper) auf unterschiedlichste Oberflächen (Glasobjektträger mit unterschiedlichsten Beschichtungen, Deckblättchen, poröse Membranen, Gele und Plastik) zu bringen. InkJet-Systeme hingegen können keine viskosen Lösungen „spotten“.

Die Aldehydobjektträger besitzen primäre Aldehydgruppen, die kovalent an die Glasoberfläche gekoppelt sind. Primäre Aminogruppen ( $\text{NH}_2$ ) der DNA reagieren mit der Aldehydegruppe (Abb. 11 links) und bilden eine kovalente Bindung (Abb. 11 Mitte). Die Bindung wird durch eine Dehydrierungsreaktion (Trocknung mit geringer Luftfeuchtigkeit) weiter stabilisiert, was zur Bildung einer Schiffsbasis führt (Abb. 11 rechts). Diese spezifische und kovalente Bindung ist sehr stabil und weiter zugänglich für Genexpressions- und Genotypisierungsexperimente. In den letzten Jahren hat sich die Spottingtechnik weniger weiterentwickelt als die



**Abb. 11: DNA-Aldehyd Kopplungsreaktion**

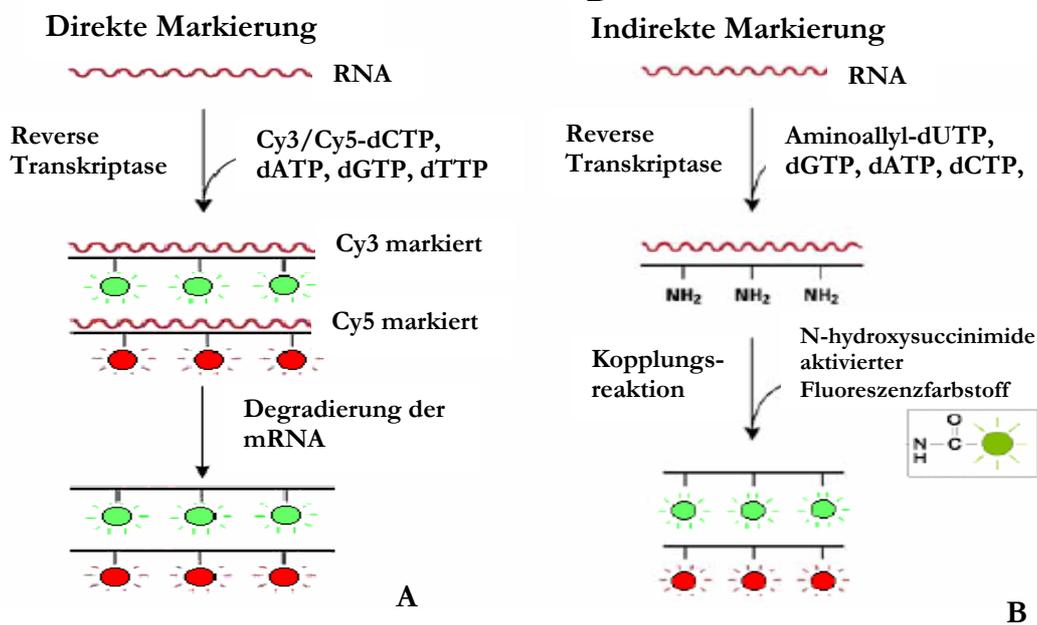
Dargestellt ist die chemische Kopplungsreaktion der primären Aminogruppe der DNA mit der Aldehydgruppe des beschichteten Objektträgers. Zuerst erfolgt eine kovalente Bindung, die durch einen Dehydrierungsschritt zu einer Bildung einer Schiffsbasis führt. (Quelle: Telechem)

Ausstattung der Spotter wie z.B. mit Klimaanlage, Plattenkühlern, die Entwicklung präziserer Pins, die kleinere und mehr uniforme Spots bei weniger Verbrauch an Sondenmaterial ermöglichen und die Fähigkeit mehr Mikroarrays in einem Spottingprozeß herzustellen (bis zu 200 Mikroarray Objektträger). Eine der interessantesten Entwicklungen in der laborbasierenden Mikroarray Herstellung sind die maskenlosen Array Synthesizer (MAS), die anstatt mit Chrommasken mit virtuellen Masken aus dem Computer arbeiten und dazu digitale Mikrospiegel verwenden. Ein eins zu eins reflektives, bildgebendes Verfahren formiert ein ultraviolettes Bild der virtuellen Maske auf die aktivierte Glasoberfläche, die in einer Flußzellreaktionskammer eingebettet ist und direkt mit einem DNA-Synthesizer verbunden ist. Programmierte chemische Kopplungszyklen, gefolgt von ultravioletter Bestrahlung, werden so lange mit verschiedenen virtuellen Masken wiederholt, bis die gewünschten Oligonukleotide in einem bestimmten Gridmuster hergestellt sind. Man kann hiermit einen Mikroarray mit bis zu 80.000 Oligos mit je  $16 \mu\text{m}$  Spots herstellen. Mit Hilfe dieser Arrays können anschließend auch SNPs unterschieden werden (ein Basenaustausch ist bereits detektierbar).

Nach wie vor ist die Hauptapplikation von Mikroarrays aber das Messen von Genexpressionen in unterschiedlichen Situationen, wie krankes gegen normales Gewebe (Lock et al., 2002), Erstellen von Tumorprofilen und deren Korrelation mit den Patientendaten (Dhanasekaran et al., 2001; Hedenfalk et al., 2001; Shipp et al., 2002; van 't Veer et al., 2002), Genregulation in verschiedenen Entwicklungsstadien (Miki et al., 2001) und nach der Stimulierung von Zellen (Iyer et al., 1999). Weitere Mikroarray Applikationen sind komparative genomische Hybridisierung (Pollack et al., 1999), Chromatin-Immunoprecipitation (Lo et al., 2001; Shannon and Rao, 2002), Detektion von Mutationen (Ahrendt et al., 1999), Genotypisierung (Lindblad-Toh et al., 2000a; Lindblad-Toh et al., 2000b) und mit Mikroarray durchgeführte Zelltransfektion (Ziauddin and Sabatini, 2001).

### 6.3 cDNA Markierung und Mikroarray Hybridisierung

Expressionsanalysen mittels Glasmikroarrays erfolgen in der Regel kompetitiv (die cDNA der Test- bzw. Referenzprobe werden mit Cy3, bzw. Cy5 markiert) (Schena et al., 1996). Dabei kann jede Probe paarweise mit jeder anderen Probe oder jede Probe gegen ein Gemisch aus mehreren Proben bzw. eine Referenzprobe verglichen werden (Kerr and Churchill, 2001c). Referenzproben sind erhältlich von kommerziellen Anbietern wie Stratagene oder Clontech, aber auch einige Labore haben mittlerweile standardisierte Referenzproben entwickelt. Wichtig ist dabei, dass möglichst große Chargen der Referenz-RNA produziert werden und die Variationen von Charge zu Charge möglichst klein gehalten werden. Ein neuer Referenzstandard könnte demnächst ein Gemisch aus markierten Oligonukleotiden sein, der zu jeder Sonde auf dem Mikroarray komplementär ist (Dudley et al., 2002). Die meisten RNA-Markierungsprotokolle basieren auf reverser Transkription von entweder aufgereinigter poly(A) mRNA oder gesamt RNA Extrakten. Eine intensive Aufreinigung der RNA ist notwendig, um eine Kontamination von Protein, Polysacchariden, sonstigen organischen Material und insbesondere RNAsen zu vermeiden, die zum Teil eine störende Eigenfluoreszenz haben. Für die Markierung haben sich zwei Methoden etabliert. Die direkte Markierung, bei dem die mRNA-Synthese durch einen poly (dT)-Primer initiiert wird und fluoreszenzmarkierte Nucleotide in die cDNA eingebaut werden (Cy3- oder Cy5- konjugiert mit dCTP oder dUTP) (Abb. 12A). Cy3- oder Cy5- konjugierte Nucleotide sind aber sperrig, was ihre Inkooperation in die cDNA erschwert. Auch die Inkooperationseffizienz unterscheidet sich zwischen Cy3- und Cy5-Nucleotiden (Cy5-Nucleotide sind größer und werden schlechter als Cy3-Nucleotide durch die reverse Transkriptase eingebaut) (Yang et al., 2002b).



**Abb. 12: Direkte und indirekte Markierung**

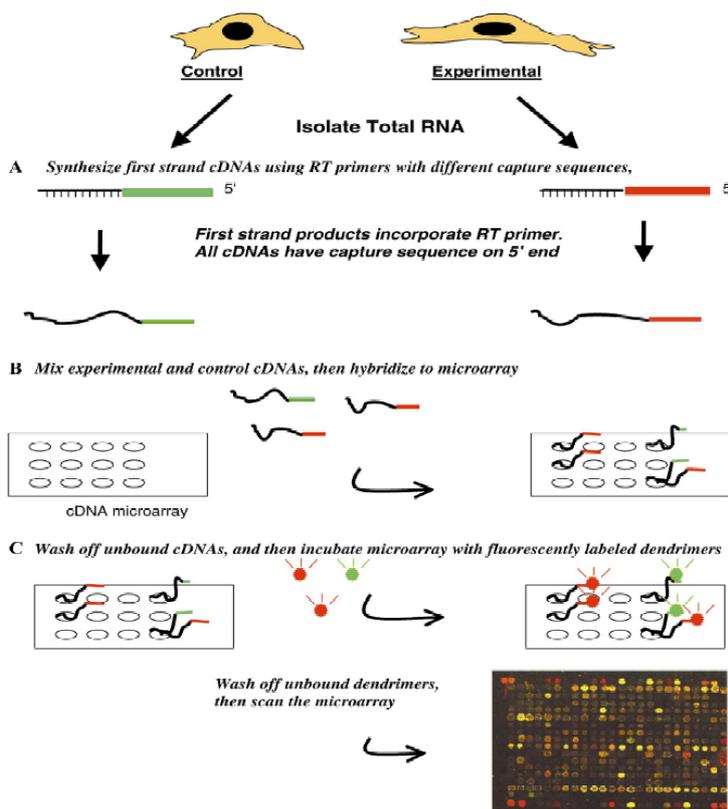
A: Direkte Markierung: cDNA-Synthese mit Cy3 und Cy5 markierten dCTPs

B: Indirekte Aminoallyl-Markierung: cDNA Synthese mit Aminoallyl markierten dUTPs und anschließende Kopplungsreaktion mit Cy3 und Cy5 (Yu et al., 2002)

Um bei der Auswertung keine Artefakte aufgrund der unterschiedlichen Inkooperationseffizienzen zu bekommen, ist es für die Versuchsplanung wichtig einen „Color Flip“ durchzuführen. Der „Color Flip“ besteht aus mindestens zwei Hybridisierungen: eine Hybridisierung, bei der die zu untersuchende Probe mit Cy3 und die Referenz mit Cy5 markiert wird und eine, bei der die zu untersuchende Probe mit Cy5 und die Referenz mit Cy3 markiert wird. Seit

kurzem sind aber reverse Transkriptasen erhältlich, die einen effizienteren Einbau von fluoreszenzmarkierten Nucleotiden ermöglichen (z.B. Fluoroskript, Invitrogen). Eine alternative Methode zur direkten Markierung ist die indirekte Markierung, auch Aminoallyl Markierung genannt, in der die Inkooperation von sperrigen fluoreszenzmarkierten Nucleotiden vermieden wird. Stattdessen werden Aminoallyl modifizierte dUTPs statt der fluoreszenzmarkierten Nucleotide verwendet (Abb. 12B). Nach der reversen Transkription kann die freie Aminogruppe auf den Aminoallyl dUTPs mit einem reaktiven N-hydroxysuccinimylester Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden.

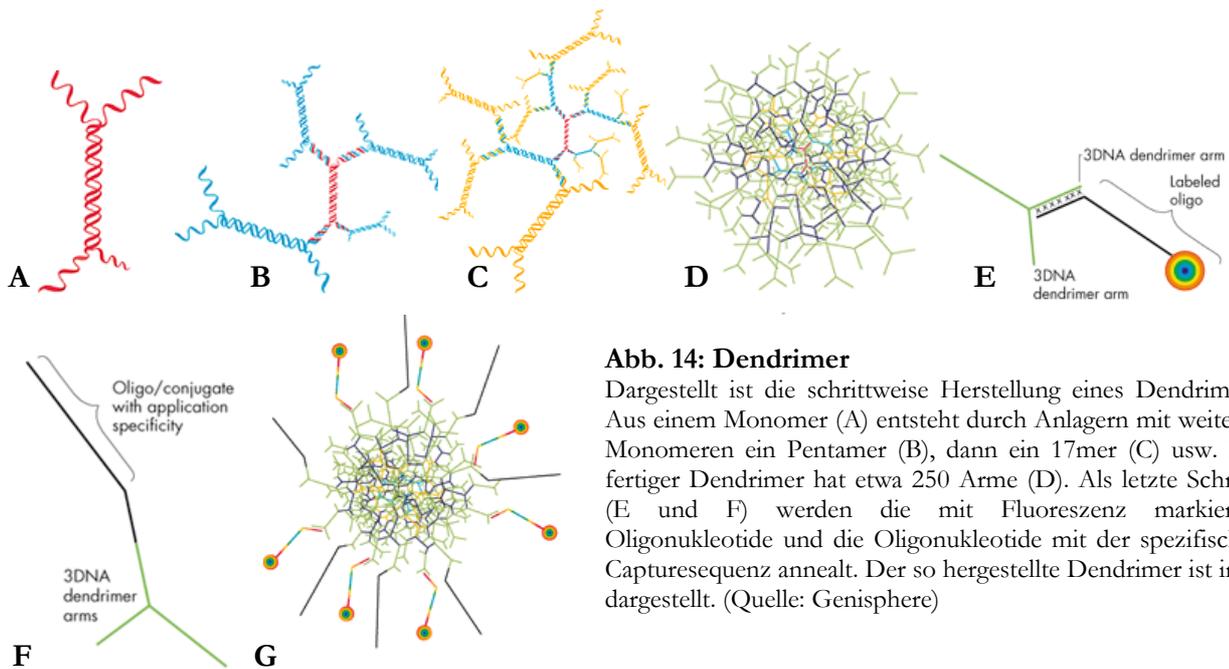
Eine erst seit kurzem zur Verfügung stehende Markierungsmethode ist die Dendrimer Markierungsmethode, auch als 3DNA Technologie beschrieben. Die RT Primer enthalten hierbei am 5' Ende eine "Capture Sequenz", die homolog zu dem fluoreszierenden 3DNA Reagenz ist. Mit Hilfe der RT Primer wird die RNA durch reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Es werden im Gegensatz zur direkten oder indirekten Markierung keine modifizierten Nucleotide verwendet. Für die beiden RNA Proben werden aber unterschiedliche Primer verwendet (sie unterscheiden sich anhand der „Capture Sequenz“). Die so gewonnenen cDNAs werden gepoolt und mit dem Mikroarray hybridisiert. Der Mikroarray wird anschließend gewaschen und mit z.B. Cy3 und Cy5 markierten Dendrimern inkubiert. Die Dendrimere enthalten die komplementäre Capturesequenz und binden spezifisch an die hybridisierten cDNAs. Die ungebundenen Dendrimere werden weggewaschen und der Mikroarray gescannt (Abb. 13).



Der Dendrimer besteht aus 3DNA Monomeren, die aus zwei DNA-Strängen bestehen. Die beiden Stränge haben eine gegenseitige komplementäre Sequenz in der Mitte. Nach dem gegenseitigen Anlagern haben die so entstandenen Monomere ein doppelsträngiges Mittelstück und vier einzelsträngige Arme (Abb. 14A). Die Arme können sich aufgrund von Sequenzhomologien an die Arme anderer Monomere anlagern. Dadurch bildet sich schrittweise ein immer größer werdendes Geflecht aus den Monomeren (Abb. 14 B-D). Im Schnitt hat ein fertiger Dendrimer etwa 250 Arme und ist 150 bis 200 nm groß. Im letzten Schritt werden sowohl markierte Oligonucleotide (z.B. Cy3 oder Cy5) als auch die „Capture Sequenz“ gebunden (Abb. 14 E-F).

**Abb. 13: 3DNA Technologie**

Hierbei wird die cDNA mit speziellen RT Primern (enthalten Capturesequenzen) hergestellt. Die Hybridisierung erfolgt wie beim direkten oder indirekten Markierung. Anschließend wird der Mikroarray mit Fluoreszenz markierten Dendrimern inkubiert. (Quelle: Genisphere)



**Abb. 14: Dendrimer**

Dargestellt ist die schrittweise Herstellung eines Dendrimers. Aus einem Monomer (A) entsteht durch Anlagern mit weiteren Monomeren ein Pentamer (B), dann ein 17mer (C) usw. Ein fertiger Dendrimer hat etwa 250 Arme (D). Als letzte Schritte (E und F) werden die mit Fluoreszenz markierten Oligonukleotide und die Oligonukleotide mit der spezifischen Capturesequenz annealt. Der so hergestellte Dendrimer ist in G dargestellt. (Quelle: Genisphere)

Als weitere Markierungsmethode gibt es noch die Markierung mittels TSA. Hierbei werden die RNAs mit Biotin oder Fluorescein markierten Nukleotiden in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wird anschließend mit den Mikroarrays hybridisiert und die Biotin- und Fluorescein markierte cDNA durch Cy3 und Cy5 markierte Reportermoleküle detektiert.

Bis vor kurzem waren die Möglichkeiten einen Mikroarray zu hybridisieren sehr limitiert. In der Regel wurde unter Coverslips oder in Hybridisierungskammern bei einer bestimmten Temperatur hybridisiert (Bowtell and Sambrook, 2002a). Die Sondenverteilung auf dem Chip war dabei sehr oft problematisch, da Variationen der Genexpression oft nur abhängig von der Position auf den Mikroarray waren, weswegen immer Duplikate empfehlenswert sind (Colantuoni et al., 2002). Mittlerweile gibt es viele kommerzielle Systeme, die eine gleichmäßige Probenverteilung ermöglichen und damit die Sondenpositionen keinen Einfluß mehr auf die gemessene Expression haben (vibrierende, Temperatur kontrollierte Plattformen oder kontrollierter, ständiger Probendurchlauf). Zuletzt wird die Bindung der Proben an die Sonde mittels konfokalem Laserscanning oder mittels einer charge couples device (CCD) Kamera detektiert.

## 6.4 Fehlerquellen bei Mikroarray Experimenten

Die Miniaturisierung, die den Mikroarrays das Potential gibt, schnell und mit geringem materiellem Aufwand Zehntausende von Genen in einem Experiment zu untersuchen, impliziert auch den Nachteil von technischen Interferenzen. Staubpartikel, Salzkristalle oder Inhomogenität der Oberflächenbeschichtung der Mikroarray Objektträger kann die Detektion des Fluoreszenzsignals von mehreren hundert Sonden stören. Auch inhomogene Spotmorphologien, oft verursacht durch fehlerhafte Spotting Nadeln, Sondenkonzentration und Evaporierung während des Spotting Prozesses („Doughnut Effekt“), müssen oft von der Auswertung ausgeschlossen werden.

„Spotten“ von cDNA Mikroarrays in hoher Qualität erfordert den passenden Spotting Puffer je nach Spotting Technologie und Oberflächenmaterial der Glasobjektträger, sowie die Entwicklung von Protokollen für eine geeignete Behandlung der Mikroarrays nach dem Spotten. Dies beinhaltet die Rehydrierung, das Blocken, das

Aufbewahren, die Prähybridisierung, die Hybridisierung und das Waschen der Mikroarrays (Rickman et al., 2003). Lokale Gradienten in der Signalintensität über den Mikroarray können von inhomogener Hintergrundfluoreszenz durch ungebundene markierte Nukleotide hervorgerufen werden. Die Hybridisierungskinetik in dem dünnen Flüssigkeitsfilm zwischen der Mikroarray Oberfläche und dem Deckplättchen ist limitiert auf Diffusion und somit abhängig von Temperatur und Puffer. In den letzten Jahren haben sich aber immer mehr Hybridisierungsstationen durchgesetzt, die temperaturkontrollierte Hybridisierungskammern ausgestattet mit Mikropumpensystemen beinhalten, um stabilere Hybridisierungskonditionen mit einer deutlich besseren Mischung der Proben durch Konvektionsströme zu ermöglichen.

Extreme Sorgfalt ist aber nicht nur bei der Produktion der Mikroarrays nötig. Sowohl während der Probenpräparation als auch bei der RNA Extraktion können geringe Veränderungen einen großen Einfluss auf das Expressionslevel und die RNA Qualität haben. So enthalten z.B. die meisten Gewebe Subpopulationen von unterschiedlichen Zelltypen, die das Expressionssignal von potentiellen Kandidatengenen „verwässern“ oder zu Fehlinterpretationen der Genexpressionsdaten führen können. Variationen in den Proben können z.T. durch Poolen der RNA aus ähnlichem Probenmaterial ausgeglichen werden. Neue Methoden wie die Laser Mikrodisektion sind hilfreich, um Zellsubpopulationen von heterogenen Gewebe wie Tumoren zu isolieren (Todd et al., 2002). So sind Mikroarray Studien mit Probenmaterial aus Mikrodisektion von nur wenigen hundert Zellen publiziert (Feldman et al., 2002; Xiang et al., 2003).

Auch können durch die schon oben beschriebene unterschiedliche Inkorporationseffizienz von markierten Nukleotiden Genexpressionsartefakte auftreten, die durch geeignete Normalisierungsstrategien sowie einer dem Problem angepassten Versuchsplanung wie „Colourflip“ Experimente ausgeglichen werden.

Obwohl sowohl akademische als auch kommerzielle Labors in den letzten Jahren einen immensen Aufwand betrieben haben, um all diese Probleme zu überwinden, gibt es noch immer keinen „goldenen Standard“ für die Produktion und die Nutzung der Mikroarrays in hoher Qualität. Als Konsequenz muß jedes Labor Zeit und Aufwand investieren, um eigene Protokolle abhängig vom jeweiligen Projekt, den zur Verfügung stehenden Instrumenten und Budget zu etablieren. Nur durch strikte Qualitätskontrollen in der Mikroarray Produktion, Prozessierung und Datenauswertung können konsistente Ergebnisse garantiert werden.

## 6.5 Prozessierung der Mikroarray Daten

Der Überblick des vorhergehenden Kapitels über technische Probleme, die bei Mikroarray Experimenten auftreten können, betont, dass diese Technologie noch weit von routinemäßiger Anwendung ohne Expertenwissen entfernt ist. Sobald aber eine große Menge von Genexpressionsdaten technisch erfolgreicher Experimente produziert ist, ist es eine Herausforderung, diese Daten zu filtern, zu analysieren, interessante Zielgene zu identifizieren und deren Funktionen und Signalwege zu interpretieren. Nach dem Scannen der hybridisierten Mikroarray Daten erfolgt die Analyse der so entstandenen Tiff-Bilder, die Datenakquisition, das Prozessieren, die Analyse und die Interpretation der Daten. Die Datenakquisition beinhaltet in der Regel die „Spoterkennung“ sowie die Definition und die Subtraktion des Mikroarray Hintergrundes. Bei den „zwei Farben“ Mikroarray Experimenten werden zwei Tiff-Bilder bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen generiert und digital übereinandergelegt. Der Medianwert des Intensitätsverhältnisses wird danach für jeden „Spot“ kalkuliert und korreliert mit der jeweiligen Probenannotation.

Die daraus resultierenden Daten werden als „Tab-delimited“ Textfiles gespeichert und in Programme für Mikroarray Datenanalysen importiert. Die „Spotfindung“ erfolgt in der Regel durch bereits definierte „Spotmuster“, die über das Tiff-Bild gelegt werden, und über das dann automatisch ein Großteil der Spots erkannt wird. Die restlichen „Spots“ werden anschließend manuell detektiert. Anschließend erkennt die Software die Größe und die Gestalt der einzelnen „Spots“. Jede Spotposition ist mit z.B. dem Gennamen, der Genabkürzung, Genbank ID, Unigen Nummer oder Sequenz verknüpft. Viele kommerziell erhältliche Programme enthalten Algorithmen zur Identifizierung und Markierung von Artefakten wie z.B. Staubpartikel und können Signale unter einen bestimmten Intensitätswert ausschließen. Der Erfolg der Datenakquisition hängt stark von der Qualität der gespotteten Mikroarrays, der Signalintensität, dem Hintergrund und den Scanner Einstellungen ab.

Die extrahierten Rohdaten werden anschließend in kommerzielle oder „Open Source“ Programme zur Datenprozessierung und Analyse importiert. Die am häufigsten verwendeten „Open Source“ Programme sind BASE, entwickelt von der Lund University (Saal et al., 2002), TM4 vom TIGR Institute for Genomic Research (Saeed et al., 2003) oder Bioconductor (Dudoit et al., 2003). Bioconductor ist eine Sammlung von verschiedenen Anwendungen für Mikroarray Datenanalysen, die alle auf dem Statistikprogramm R basieren. Für die Nutzung dieser Anwendungen ist Programmiererfahrung nötig. TM4 ist eine Kollektion von Programmen für die Mikroarray Akquisition, Prozessierung, Analyse und Datenverwaltung und ist benutzerfreundlicher, aber weniger flexibel. Die Normalisierung und Analysen dieser Arbeit wurden zum Großteil mit Bioconductor durchgeführt.

Nahezu alle Mikroarray Experimente enthalten systematische Fehler wie Unterschiede beim „Spotten“ durch unterschiedliche Pins, unterschiedliche Inkorporationseffizienz von markierten Nukleotiden bei der reversen Transkription oder geringfügig unterschiedliche eingesetzte RNA Konzentrationen. Der größte systematische Fehler ist in der Regel die unterschiedliche Inkorporationseffizienz. Globale/Lineare Normalisierung ist eine einfache Methode, diesen Fehler auszugleichen. Sie basiert auf die Annahme, dass die Expression der Großteil der Gene bei dem Vergleich von zwei experimentellen Konditionen unverändert ist (>95%). Das heißt, nach dem Ausschluss von Ausreißern und Spots mit sehr niedriger Signalintensität wird ein Normalisierungsfaktor  $N$  berechnet. Alle individuellen Genexpressionsverhältnisse werden dann mit  $N$  multipliziert, so dass am Ende der Durchschnitt aller Genexpressionsverhältnisse 1 beträgt (Quackenbush, 2002). Die Annahme, dass der Großteil der Gene bei dem Vergleich von zwei experimentellen Konditionen unverändert ist, ist nicht gültig bei Mikroarrays mit geringer Sondenanzahl, insbesondere wenn diese Mikroarrays ausgewählte Gene oder Signalwege beinhalten, die durch das Experiment an- oder abgeschaltet werden (van de Peppel et al. 2003). Die Annahme ist ebenfalls ungültig bei systematischen, nicht linearen oder intensitätsabhängigen Effekten. Lokale Veränderungen auf dem Mikroarray können durch Kontrollgene detektiert und quantifiziert werden. Hierzu werden artfremde mRNAs oder markierte Oligonukleotide in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Proben hinzugefügt (z.B. Arabidopsis Kontrollgene zu humanen Mikroarrays). Die inversen komplementären über den gesamten Mikroarray verteilten Sonden detektieren dann diese Kontrollgene, und unterschiedliche Intensitäten oder Verhältnisse desselben Kontrollgens deuten auf systematische Fehler hin. Nicht lineare Normalisierungen wie die Loess (locally weighted linear regression analysis) Normalisierung reduzieren intensitätsabhängige Genexpressionseffekte. Lokale Normalisierungen hingegen sind hilfreich bei räumlichen Variationen, wie z.B. unterschiedlichen Spotmorphologien in unterschiedlichen Bereichen des Mikroarrays ((Colantuoni et al., 2002).

Nach der Normalisierung können durch bestimmte Algorithmen die Daten gefiltert werden, um „Datenrauschen“, welches insbesondere bei niedrigen Signalintensitäten vorkommt, zu eliminieren. Dies reduziert die Menge und Komplexität der Daten. Die meisten Programme bieten die Möglichkeit, Daten unter einem festen oder prozentualen Intensitätsschwellenwert zu verwerfen. Neuere Algorithmen kalkulieren den lokalen Hintergrund und dessen Standardabweichung und behalten nur die Daten, die sich vom lokalen Hintergrund um einen vorher fest gesetzten Konfidenzwert unterscheiden (z.B. 95%) (Quackenbush, 2002). Es werden in der Regel auch die Daten herausgefiltert, die sich unterschiedlich in Replikatexperimenten, „Colour Flip“ Experimenten und in Replikaten auf demselben Mikroarray verhalten, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Das Ziel der meisten Genexpressionsprofilstudien ist es eine übersichtliche Liste von Kandidatengenen zu erhalten, die sich in der Genexpression unter zwei unterschiedlichen biologischen Konditionen unterscheiden. Der üblichste Weg hierzu ist es, einen den Daten entsprechenden Schwellenwert eines Verhältnisses zu setzen, und Gene, die darüber bzw. darunter liegen, als differentiell expremiert anzusehen.

Viele Studien haben die Notwendigkeit von Replikaten in Mikroarray Experimenten gezeigt (Pan et al. 2002). Technische Replikate sind geeignet, um Datenrauschen und falsch positive Ergebnisse bei identischem Untersuchungsmaterial herauszufiltern, während biologische Replikate die biologische Variabilität zwischen individuellen Organismen, Zellkultur oder Gewebeproben reflektieren. In dieser Arbeit wurden in der Regel vier technische Replikate verwendet, wobei sich jede Sonde mindestens zweimal auf jedem Mikroarray befindet, so dass mindestens acht Genexpressionswerte zu jeder Sonde vorhanden sind (inklusive „Colourflip“).

Es wurden zahlreiche Methoden zur Gruppierung von Kandidatengenen sowie Experimente in Clustern entwickelt, um komplexe Genexpressionsmatrixen zu interpretieren. Cluster Algorithmen werden in „supervised“ und „unsupervised“ Methoden unterteilt, abhängig davon, ob irgendwelche zusätzlichen Informationen über die Natur der Proben oder Experimente das Muster bestimmen nach dem die Gene oder Experimente sortiert werden, oder ob der Clusterprozess eine Struktur in die Daten ohne vorhergehende Informationen findet. In dieser Arbeit wurde die „unsupervised“ Methode verwendet, die auch in den meisten Mikroarray Publikationen verwendet wird. Die „unsupervised“ Methoden sind Prinzip-Komponenten Analysen, „k-means“ Clustering, hierarchisches Clustern und Netzwerk Determinationen wie Boolean oder Bayesian. K-mean (Soukas et al., 2000) und hierarchisches Clustern (Eisen et al., 1998; Iyer et al., 1999) sind einfache, iterative Methoden, um Gene oder Experimente nach ähnlichen Mustern zu gruppieren.

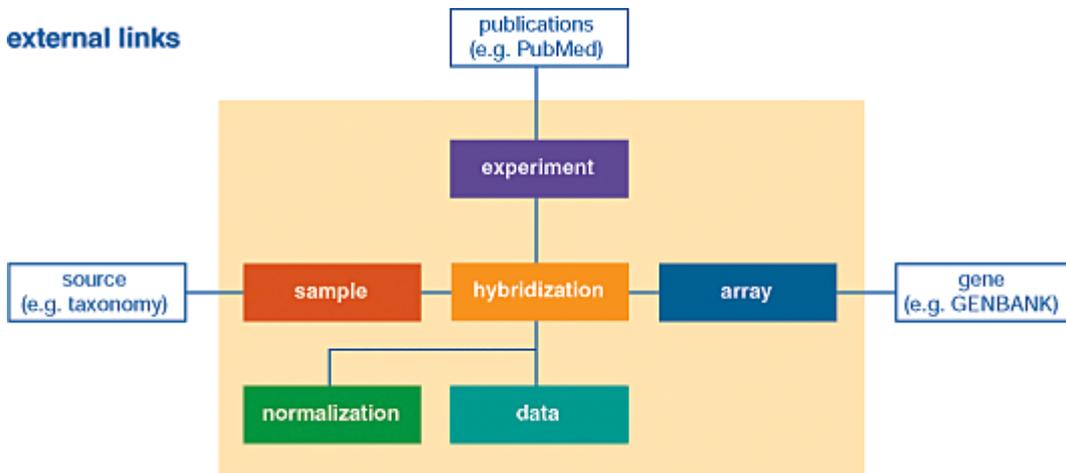
## 6.6 Dateninterpretation

Die meisten Datenanalyseprogramme produzieren eine Liste von Kandidatengenen, die charakterisiert sind durch ihre Genexpressionsveränderung. Genannotation ist hierbei ein entscheidender Faktor, um die biologische Bedeutung der Liste dieser Gene zu interpretieren. Kandidatengene werden über die Sondensequenz identifiziert und sind verknüpft mit unique und universalen Genidentifikationen. Vernetzungen zu weiteren Datenbanken ermöglichen Literatursuche, weiterführende Genexpressionsdaten, Gen-Protein und Protein-Protein Interaktionen sowie Informationen über den Promotor, chromosomale Lokalisation etc.. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden substantielle Verbesserungen in der Qualität und Zugänglichkeit von Genannotationen erreicht, jedoch machen noch immer fehlende Annotationen, Redundanz und nicht systematische Nomenklaturen in den

Datenbanken die Dateninterpretation schwierig und zeitraubend. Das „Gene Ontology“ (GO) Konsortium versucht aktuell dieses Problem z.T. zu lösen, indem es Gene und Genfunktionen in standardisierten Strukturen und Termina verbindet, die wiederum mit öffentlichen Datenbanken vernetzt sind. Der Vergleich von Mikroarray Daten unterschiedlicher Labors und Hersteller erfolgt am besten über Refseq Nummern, UniGene Nummern und LokusLink IDs.

## 6.7 MIAME (Minimum Information About Mikroarray Experiment)

Mikroarrays wurden in den letzten Jahren immer häufiger genutzt für die Generierung von Genexpressionsdaten. Obwohl immer mehr gesicherte signifikante Ergebnisse aus dem Bereich Mikroarrays publiziert wurden, fehlte es anfangs an einem Standard für die Präsentation und den Austausch von Mikroarray Daten. Der Vergleich von Genexpressionsdaten ist schwierig, da bis heute die Genexpressionsniveaus der Mikroarrays nicht in objektivierbaren Einheiten gemessen werden können. Die meisten Mikroarray Studien zeigen eine relative Veränderung der Genexpression zu einer Reverenz, die nur in den seltensten Fällen standardisiert ist. Auch die Verwendung unterschiedlicher Mikroarray Plattformen und experimenteller Designs führt zu Daten in unterschiedlichen Formaten und Einheiten und diese werden noch auf unterschiedliche Arten normalisiert. All diese Faktoren machen einen Vergleich und eine Integration verschiedener Mikroarray Daten schwierig und diese sind dann auch fehlerbehaftet (Aach et al., 2000; Quackenbush, 2001). Viele publizierte Daten enthalten zudem nur das Verhältnis; es fehlt hierbei die Information über die Intensität der eigentlichen Signale als auch wie die Signale berechnet wurden (z.B. ob der Mittelwert oder der Median der Hintergrundintensität von der Signalintensität subtrahiert wurde oder ob der Hintergrund über den kompletten Mikroarray oder lokal um jeden Spot berechnet wurde usw.). Es wächst der wissenschaftliche Bedarf für öffentliche Mikroarray Datenbanken, die aber auch zusätzliche Informationen zu den einzelnen Mikroarray Experimente haben sollen (2001; Brazma et al., 2000). Solche Datenbanken sind mittlerweile in der Entwicklung durch das National Center for Biotechnology Information, die DNA Database aus Japan und das European Bioinformatic Institute. Um einen Standard für Mikroarray Datenaufbereitung zu schaffen, wurde der Standard MIAME entwickelt (Brazma et al., 2001).



**Abb. 15: Schematische Darstellung der sechs MIAME Forderungen**

Die Abbildung zeigt die sechs im Text beschriebenen MIAME Forderungen (Brazma et al., 2001).

Wie aus Abb. 15 ersichtlich, besteht die minimale Information über ein Mikroarray Experiment aus sechs Forderungen:

1. **Der Aufbau des Experiments:** Jedes Experiment muss einen Autor (mit Kontaktadresse) Links (URL), Zitierungen und einen kurzen Titel haben. Auch der Typ des Experiments (z.B. Vergleich gesundes versus „krankes“ Gewebe, Zeit- oder Dosis- abhängige Entnahmen, usw.) und die experimentellen Variablen (Zeit, Dosis, genetische Variationen, usw.) müssen verfügbar sein. In diesem Kapitel werden auch Indikatoren für die Qualität wie Replikate, Qualitätskontrollen beschrieben.
2. **Mikroarray Design:** Diese Liste besteht aus den physikalischen Eigenschaften der Arrays. So muss jeder Array einzeln und spezifisch beschriftet sein. Auch Informationen zu dem Mikroarray (z.B. Oberfläche, Firma, Bestellnummer, Beschaffenheit des gespotteten Produkts) sowie zu jedem einzelnen gespotteten Element sollten aufgelistet sein (DNA-Sequenz, Kontrollindikatoren, Klonidentifikationsnummern, Primersequenzen, usw.).
3. **Untersuchte Proben:** Hier wird die Quelle der untersuchten Proben wie Organismus, Zelltyp etc. sowie die biologischen *in vivo* und *in vitro* Behandlungen beschrieben. Ebenfalls wurden hier die Extraktionsmethoden für die Nukleinsäuren und die verwendete Markierungsmethode dargestellt.
4. **Hybridisierung:** Hier werden die Hybridisierungsparameter spezifiziert. Hierzu gehören die Hybridisierungslösungen, das Blockingreagenz, die Waschprozedur, die Menge der verwendeten markierten cDNA, die Hybridisierungszeit, das Hybridisierungsvolumen und -temperatur und die verwendeten Hybridisierungsinstrumente.
5. **Messungen:** Hier sollen alle Schritte von den Rohdaten zu den prozessierten Daten beschrieben werden. Dieses beinhaltet die Bilder der Originalscans (Tiff-File), die Mikroarray Quantifizierungsmatrix und die endgültige Genexpressionsmatrix nach der Normalisierung.
6. **Normalisierung:** Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Normalisierungsmöglichkeiten wie Gesamtintensitäts-, Verhältnis basierende, Lineare und nicht lineare Regressionsnormalisierung und viele weitere. Auch können diese Normalisierungen sich auf das komplette Datenset oder nur einen Teil der Daten beziehen und Kontrollen wie Spikes, Negativkontrollen oder Housekeeping Gene einbezogen werden. Für MIAME sollte sowohl die Normalisierungsstrategie (Spikes, Housekeepinggene, Gesamter Array, usw.), die Normalisierung an sich und der verwendete Algorithmus sowie eine kurze Beschreibung der verwendeten Kontrollen und deren Lokalisationen auf dem Mikroarray beschrieben werden.

Dieser Standard wird momentan sowohl für die Entwicklung neuer Software und Datenbanken verwendet als auch schon von einigen Zeitschriften als Anforderung für Publikationen verlangt. Auch die ersten webbasierten Datenmodelle, die auf MIAME basieren, sind in der Entwicklung, wobei ausreichender Speicherplatz für die Aufbewahrung der gescannten Bilder eines der größten Probleme ist.

## 6.8 Mikroarray Applikationen und Ausblick

Neben der Determination von Genexpressionsprofilen setzt sich das Mikroarray Prinzip des Testens von Proben mit großen immobilisierten Sondensets auf kleinem Raum auch in Applikationen wie CGH (comparative genome hybridisation analysis) immer mehr durch (mittels CGH können chromosomale Duplikationen oder Deletionen

untersucht werden). Auch werden Mikroarrays immer mehr in Genotypisierungsstudien verwendet, wo mehrere hunderttausende individuelle SNPs in einem Experiment untersucht werden können. Weitere Anwendungen im Mikroarray Format sind Proteinexpressionsstudien mit Antikörpermikroarrays, die Interaktion von Proteinen mit anderen Proteinen (MacBeath, 2002), Organischen Molekülen, Kohlenhydrate (Wang et al., 2002a) oder Peptide (Robinson et al., 2002).

Aktuell wurde der erste mikroarraybasierende diagnostische Test von der europäischen Union zugelassen. Der „Amplichip“ ist ein Kooperationsprodukt von Roche Diagnostik und Affymetrix Inc., der ein schnelles Testen von Variationen der Cytochrome CYP2D6 und CYP2C19 in Blutproben ermöglicht. Da diese Enzyme eine wichtige Rolle im Metabolismus von Medikamenten spielen, kann dieser Test wertvolle Informationen zur optimalen Dosierung von Medikamenten für jeden individuellen Patienten geben und starke Nebenwirkungen bei langsamer metabolisierenden Individuen vermeiden. Die Entwicklung von genetischen Tests im Gesundheitssektor kann als wichtiger Schritt zur individuellen Medikation gesehen werden (Newswire, 2004).

## 6.9 Ziel der Arbeit

In Vorarbeiten der Institute für molekulare Pathologie der TU-München und GSF Neuherberg wurde gezeigt, dass verschiedene E-Cadherin Mutationen im Vergleich zu Wildtyp-E-Cadherin in MDA-MB-435S Zellen zu einer veränderten Motilität und Adhäsion führen. Basierend auf diesen Ergebnissen war das Gesamtziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von mutiertem E-Cadherin auf das Genexpressionsprofil hin zu untersuchen und dadurch therapeutisch interessante Zielmoleküle für Therapieansätze zur Behandlung maligner Tumoren mit E-Cadherin Mutationen zu identifizieren. Hierzu sollte ein cDNA Mikroarray entwickelt und etabliert werden, der das Untersuchen der Genexpression von über tausend Karzinom- und E-Cadherin relevanten Genen in einem einzigen Experiment ermöglicht. Anschließend sollen einzelne relevante differentiell exprimierte Gene validiert und weiter charakterisiert werden.

# C Material und Methoden

## 1. Material

### 1.1 Geräte

Gerät	Firma, Ort
ABI PRISM 377 DNA Sequenzer	Perkin-Elmer, Überlingen
ABI PRISM 7700 Sequence Detection System	PE Applied Biosystems, Überlingen
Affymetrix 417 Arrayer	MWG-Biotech, Ebersberg
Affymetrix 418 Scanner	MWG-Biotech, Ebersberg
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, München
EagleEye (Bildgebend)	Stratagene, Heidelberg
FACS EPICS® XL	Beckmann Coulter, Krefeld
Filmentwicklungsgerät	AGFA, München
Geigerzähler	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Gelkammern	BioRad, München
Heiz-/ Rührgerät	IKA-Labortechnik, Staufen
Inkubationsrad	Bachofer, Reutlingen
Inkubationsschüttler G25	New Brunswick, Nürtingen
Kühlzentrifuge 4K15	Sigma, Deisenhofen
Kühlzentrifuge 5471R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge GS-6R	Beckmann, München
Kühlzentrifuge RC-5B	DuPont, Bad Homburg
Mehrkanalpipette (12 Kanal)	Schubert and Weiss, München
Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Multi Cycler (96er)	MJ Research, Watertown, USA
Nassblotapparatur	Bio-Rad, München
Netzgerät (Power PAC 300)	BioRad, München
Pipetierroboter Biomek 2000	Beckmann Coulter, Krefeld
Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Ultra-Turrax T8	IKA Labortechnik, Staufen
Robo Cycler (96er)	Stratagene, Heidelberg
Schüttler	Heidolph, Kelheim
Spektrophotometer (96er)	Molecular Devices, Ismaning
Speedvac	Savant, Farmingdale, USA
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus, München
Thermocycler Primus 96 <sup>plus</sup>	MWG-Biotech, Ebersberg
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Universalinkubationsschrank	Memmert, Schwabach
UV/Vis Spektrophotometer DU® 530	Beckmann, München
UV-Crosslinker	Stratagene, Heidelberg
Vakuum Konzentrador Zentrifuge (96er)	Uni Equip, Laborgerätebau, Martinsried
Waagen	Julabo, Seelbach
Zeiss Axiovert 135 Konfokales Fluoreszenz Zellzählgerät Z1	Coulter, München

## 1.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma, Ort
40% Acrylamid/Bisacrylamid Solution	BioRad, München
Aceton <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
BioRad Protein Assay	BioRad, München
Blue Dextran Loading Buffer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Coomassie Blau R250	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol <i>p.a.</i> (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hepes (N-2-Hydroxymethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Humane C <sub>0</sub> t-1 DNA	Life Technologies, Karlsruhe
Isopropanol <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt
Ladepuffer	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Meta Phor® Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Methanol <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt
Microcon YM-30	Millipore, Schwalbach
Polydeoxyadenylic Acid	Amersham Bioscience, Freiburg
SeaKem® LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Natriumacetat Puffer Lösung	Sigma, Deisenhofen
Polyacrylamide Page Plus	Amresco, Göttingen
Natriumborhydrid	Sigma, Deisenhofen
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS), 20% Solution	Eurobio, Raunheim
TBE Puffer (10fach)	BioRad, München
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	USB, Cleveland, Ohio
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Trizol	Gibco BRL, Eggenstein
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Urea	Amresco, Ohio, USA

## 1.3 Antibiotika

Antibiotikum	Firma, Ort
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Geneticin (G418 Sulphat)	Gibco BRL, Eggenstein
Kanamycin Seromed	Biochrom KG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Puromycin	Sigma, Deisenhofen
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen

## 1.4 Enzyme

Enzym	Firma, Ort
ACC1	NEB, Frankfurt am Main
AFL3	NEB, Frankfurt am Main
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
DNA Polymerase (BioTherm)	GeneCraft, Münster
HPH1	NEB, Frankfurt am Main
KPN1	NEB, Frankfurt am Main
Meerettich-Peroxidase (IgG-gekoppelt)	Amersham, Braunschweig
Restriktionsendonukleasen	Gibco BRL, Eggenstein
Ribonuklease Inhibitor	Life Technologies, Karlsruhe
Superscript II RT (Reverse Transkriptase)	Life Technologies, Karlsruhe
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim

## 1.5 Zelllinien

Name	Gewebe	Wachstumsmedium	Morphologie	Kommentare
GRANTA-519 (Fend)	B-Zell Lymphom	DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin	sphäroid wächst in Suspension	
MCF-7 (ATCC)	Brustgewebe, Adenokarzinom	DMEM, 10 % FCS, 2.5 ml P/S	adhärent, epithelial	Östrogenrezeptor positiv
MDA-MB-435S (ATCC)	Brustgewebe, ductales Karzinom. In einer kürzlich erschiedenen Mikroarray Studie clusterte die parentale Linie (MDA- MB-435S) mit Zelllinien aus Melanoma (Ellison <i>et</i> <i>al.</i> , 2002; Ross <i>et al.</i> , 2000)	DMEM, 10 % FCS, 2.5 ml P/S	adhärent, spindelförmig	E-Cadherin negativ
D257A	Siehe MDA-MB-435S	DMEM, 10 % FCS, 2.5 ml P/S	spindelförmig	Punktmutation an der Position D257A
E273A	Siehe MDA-MB-435S	DMEM, 10 % FCS, 2.5 ml P/S	spindelförmig	Punktmutation an der Position E273A
Δ8	Siehe MDA-MB-435S	DMEM, 10 % FCS, 2.5 ml P/S	spindelförmig	Exon 8 Deletion
D370A	Siehe MDA-MB-435S	DMEM, 10 % FCS, 2.5 ml P/S	spindelförmig	Punktmutation an der Position D370A
Δ9	Siehe MDA-MB-435S	DMEM, 10 % FCS, 2.5 ml P/S	spindelförmig	Exon 9 Deletion
D479A	Siehe MDA-MB-435S	DMEM, 10 % FCS, 2.5 ml P/S	spindelförmig	Punktmutation an der Position D479A
D590A	Siehe MDA-MB-435S	DMEM, 10 % FCS,	adhärent, spindelförmig	Punktmutation an der Position D590A

WT	Siehe MDA-MB-435S	2.5 ml P/S DMEM, 10 % FCS, 2.5 ml P/S	adhärent, spindelförmig	
MPE600 J. Gray (Hiraguri <i>et al.</i> , 1998)	Brustgewebe	Medium 199, 10% FCS, NaHCO <sub>3</sub> [2.2 mg/ml], Glucose [4.5 mg/ml], Insulin [10 µg/ml]	adhärent, epithelial	Exon 9 Deletion
HSC45 (Fukudome <i>et al.</i> , 2000)	Magen Siegelringzellkarzinom	DMEM, 10 % FCS, 2.5 ml P/S	adhärent, epithelial	Exon 9 Deletion
HTB-135 (ATCC)	Metastase von Magenkarzinom	DMEM, 10 % FCS, 2.5 ml P/S	adhärent, epithelial	E-Cadherin negativ

## 1.6 Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Firma, Ort
Dulbecco´s modified eagles medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
FCS (Fötales Kälberserum)	PAN Biotech, Aidenbach
Medium 199	Gibco BRL, Eggenstein
Optimem	Gibco BRL, Eggenstein
RPMI 1640	Gibco BRL, Eggenstein

## 1.7 Reagenzien und Zusätze für eukaryotische Zellkultur

Zusatz	Firma, Ort
Albumin Bovine Fraction V Solution (30%)	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco´s MEM (mit Glutamax, 4500 mg/l Glucose)	Gibco BRL, Eggenstein
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (1x) (mit Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	PAA, Cölbe
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (1x) (ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	PAA, Cölbe
FCS	PAN Biotech, Aidenbach
Medium 199	Gibco BRL, Eggenstein
Versen Gibco	BRL, Eggenstein
Viralex Trypsin/EDTA (1x)	PAA, Cölbe

## 1.8 Reagenzien und Medien zur Anzucht von Escherichia coli

Medium oder Reagenz	Firma, Ort
IPTG (Isopropyl-thiogalacto-pyranoside)	Sigma, Deisenhofen
LB-Agar	Gibco BRL, Eggenstein
LB-Broth	Gibco BRL, Eggenstein
X-Gal	Sigma, Deisenhofen

## 1.9 Kommerzielle Komplettsysteme

Komplettsystem	Firma, Ort
Arrayit Micro Spotting Solution Plus	TeleChem, Sunnyvale, USA
Assay-on-Demand	Applied Biosystems, Weiterstadt
Diff-Quick	Baxter, Unterschleißheim
DNA Sequencing Kit	Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien
DyeEx™ Spin Kit	QIAGEN, Hilden
ECL (enhanced chemiluminescence)	Amersham, Braunschweig
Western Blot Reagenzien	
FastPlasmid Mini	Eppendorf, Hamburg
FairPlay Mikroarray Labeling Kit	Stratagene, Heidelberg
LabelStar Array Kit	QIAGEN, Hilden
Molekulargewichtsmarker (DNA): HAE III	Roche, Mannheim
Molekulargewichtsmarker (Protein): RPN 756	Amersham, Braunschweig
Molekulargewichtsmarker (Protein): RPN 800	Amersham, Braunschweig
PCR Purifikations Kit	QIAGEN, Hilden
Prime it (Random Priming)	Stratagene, Heidelberg
QIAprep Plasmid-Kit (miniprep)	QIAGEN, Hilden
QIAprep Plasmid-Kit (midiprep)	QIAGEN, Hilden
QIAprep Plasmid-Kit (maxiprep)	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraktions Kit	QIAGEN, Hilden
TA-Klonierungs-System	Invitrogen, Leek, Holland

## 1.10 Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Coomassie Blau Färbelösung	0.1 % w/v Coomassie blau, 40 % v/v EtOH, 5 % v/v Essigsäure
Coomassie Blau Entfärbelösung	20 % v/v Methanol, 5 % v/v Essigsäure
50 x Denhardt´s	25g Polyvinylpyrrolidone (PVP), 25g Bovine Serum albumin (BSA), 25g Ficoll 400
Einfriermedium für Zellen	80% (v/v) Vollmedium 10% (v/v) FCS 10% (v/v) DMSO
Mikroarray Hybridisierungspuffer	25 % Formamid, 10 % 20xSSC, 65 % H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Mikroarray Prähybridisierungspuffer	6 x SSC, 0.5% SDS, 1% BSA
LB Medium	20 g LB Broth Base, 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
LB Platten	32 g LB Agar, 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
L-CAM-Puffer (10 fach)	1,4 M NaCl, 47 mM KCl, 7 mM MgSO <sub>4</sub> , 12 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM HEPES, pH 7,4

MOPS-Puffer (10 fach)	200 mM MOPS 50 mM NaAc 10 mM EDTA pH 7,0
MOPS-Gel	1,5 g Agarose 123 ml 1x MOPS-Puffer 27 ml 37% Formaldehyde
Hybridisierungslösung für Northern Blots	10 ml 20xSSPE, 10 ml 50x Denhardt 's Lösung, 25 ml deionisiertes Formamid, 10 ml 10 % SDS
PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O, 1,7 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, pH = 7,4
Proteindenaturierungspuffer (4fach)	250 mM Tris/HCl, pH 8,0, 8 % (w/v), SDS, 40 % (w/v), Glycerin, 20 % (w/v), β-Mercaptoethanol, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
Proteingel-Laufpuffer (5fach)	960 mM Tris, 125 mM Glycin, 0,2 % (w/v) SDS
SSC (20 fach)	3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat (Tri-Na-Citrat x 2 H <sub>2</sub> O), pH 7,0
TE (Tris-EDTA)	10 mM Tris base, 1 mM EDTA
TBE (10 fach)	1 M Tris, 0,9 M Borsäure, 0,01 M EDTA, pH 8.4
Transferpuffer für Western Blots	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
TBST-Puffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 % (v/v) Tween 20
DNA-Auftragungspuffer (5fach)	100 mM EDTA, 10 % (w/v) Ficoll, 0,5 % (w/v) SDS, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

## 1.11 Antikörper

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

Antikörper	Firma, Ort
mAK Cyclin D1	Novocastra Laboratories, Newcastle, UK
pAK Kaninchen-Anti-MMP3	Merck Biosciences, Laufelfingen, Schweiz
pAK Kaninchen-Anti-MMP3	Chemicon, Temecula, Kanada
pAK Kaninchen-Anti-VEGF	Zytomed, Berlin
Ziege-Anti-Maus IgG (Immunglobulin G), DTAF (Dichlorotriazinylamino-Fluoreszein)-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege-Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Biomol, Hamburg
SHE78-7 Anti-E-Cadherin Jackson Immuno Research Laboratories	Alexis, USA

## 1.12 cDNA Klone

Genanzahl	Gengruppe
306	Signalwege wie Wnt-, Notch-, Patched Signalweg
115	Wachstum und Entwicklung
101	Adhäsion
71	Reparatur und genomische Instabilität
62	Zellzyklus
244	Sonstige Gene wie Transkriptionsfaktoren oder in der Apoptose involvierte Gene

Bei allen cDNA-Klonen handelt es sich um I.M.A.G.E. Klone, die vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH), Berlin bezogen wurden. Der Mikroarray besteht aus 1105 cDNA Klone, die für insgesamt 899 Gene kodieren. Eine komplette Liste aller Gene ist unter:

<http://telepath.gsf.de/pathol/arrays.html> verfügbar.

Weitere Genanotationen zu den in dieser Arbeit verwendeten Genen sind in der beigefügten CD zu finden.

## 1.13 Vektor und Plasmide

Vektor	erhalten von:
pBabePuro PTEN	wurden uns freundlicherweise von Frau Rauser (München) zur Verfügung gestellt
pBK-CMV mit verschiedenen E-Cadherin Insertionen	wurden uns freundlicherweise von Dr. Handschuh (München) zur Verfügung gestellt
pEGFP-N2 Vektor	Clontech, Heidelberg
pSuper mit verschiedenen siRNA Insertionen gegen CYR61 und CDH1	wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Truss (Berlin) zur Verfügung gestellt

## 1.14 Oligonukleotide, Primer und siRNAs

Oligonukleotid	Firma, Ort
Cy3 dCTP	NEN <sup>TM</sup> Life Science, Köln
Cy5 dCTP	NEN <sup>TM</sup> Life Science, Köln
dNTP Set	Life Technologies, Karlsruhe
Oligo (dA) <sub>40-60</sub> Primer	Amersham Bioscience, Freiburg
Oligo (dT) <sub>40-60</sub> Primer	Life Technologies, Karlsruhe
Random Primer	Life Technologies, Karlsruhe
$\alpha$ - <sup>32</sup> P dTTP	Amersham Bioscience, Freiburg

Primer	Sequenz
Ecad3'	5'-GGC CAC AGC CAA TCA GCA-3'
Ecad5'	5'-TCC CAG GTC TTA GTG AGC CA-3'
M13 fw	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
M13 rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'
SP6	5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'
T3	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3'
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
Uni fw	5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG-3'
Uni rev	5'-TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG-3'
$\beta$ -catenin fw	5'-ACA ACT GTT TTG AAA ATC CA-3'
$\beta$ -catenin rev	5'-TTC TTG GTT GCC ATA AGC TA-3'

siRNA	Sequenz	
CYR61-31	Up	5'-GAT CCC CAA TGG AGC CTS GCA TCC TAT ATT CAA GAG ATA TAG GAT GCG AGG CTC CAT TTT TTT GGA AA-3'
	Low	5'-AGC TTT TCC AAA AAA ATG GAG CCT CGC ATC CTA TAT CTC TTG AAT ATA GGA TGC GAG GCT CCA TTG GG-3'
Cyr61-52	Up	5'-GAT CCC CAA GGA AGC CTT GCT CAT TCT TTT CAA GAG AAA GAA TGA GCA AGG CTT CCT TTT TTT GGA AA-3'
	Low	5'-AGC TTT TCC AAA AAA AGG AAG CCT TGC TCA TTC TTT CTC TTG AAA AGA ATG AGC AAG GCT TCC TTG GG-3'
CYR61-72	Up	5'-GAT CCC CAA GAC CTG TGG AAC TGG TAT CTT CAA GAG AGA TAC CAG TTC CAC AGG TCT TTT TTT GGA AA-3'
	Low	5'-AGC TTT TCC AAA AAA AGA CCT GTG GAA CTG GTA TCT CTC TTG AAG ATA CCA GTT CCA CAG GTC TGG GG
CDH1-94	Up	5'-GAT CCC CAA GCA GCA GTA CAT TCT ACA CTT CAA GAG AGT GTA GAA TGT ACT GCT GCT TTT TTT GGA AA-3'
	Low	5'-AGC TTT TCC AAA AAA AGC AGC AGT ACA TTC TAC ACT CTC TTG AAG TGT AGA ATG TAC TGC TGC TTG GG-3'

### 1.15 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma, Ort
3MM Papier, Whatman	M&B Stricker, Oberschleißheim
96er PCR-Platten mit Rand	la fontaine international, Waghäusel
Adhesive PCR Abdeckfolien	ABgene, Hamburg
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Array Validation System (SpotReport-10)	Stratagene, Heidelberg
cDNA Mikroarray Objektträger (Aldehyde)	Genetix, München
cDNA Mikroarray Objektträger (Aldehyde)	TeleChem, Sunnyvale, USA
Einmalpipetten 5ml, 10ml und 25 ml	Greiner, Frickenhausen
Falconröhrchen 15ml und 25 ml	Greiner, Frickenhausen
Filterpapier	M&B Stricker, Oberschleißheim
FluoroLink Cy3 monofunctional dye	Amersham Bioscience, Freiburg
FluoroLink Cy5 monofunctional dye	Amersham Bioscience, Freiburg
Gas permeable adhesive	Macherey & Nagel, Düren
Human COT-1 DNA	Invitrogen, Leek, Holland
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Küvetten (1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
LifterSlip	Erie Scientific, Portsmouth, USA
Micro caps	ABgene, Hamburg
MicroSpin G-50 Columns	Amersham Bioscience, Freiburg
MicroWell Platten 96er, 0,3 ml	NUNC, Wiesbaden
Mikrotiterplatten (96well)	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Multiscreen-PCR 96er Filtrationssystem	Millipore, Schwalbach
Nitrozellulose Transfer Membran, 0,2 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Nylonmembran (positiv geladen)	Schleicher & Schüll, Dassel
Objektträger (R. Langenbrinck, 76x26 mm)	Labor Schubert und Weiss, München
Objektträger (Super Frost, 76x26 mm)	MICROM International, Walldorf
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR 5-Strip tubes	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen (für Bakteriologie)	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen für FACS-Analyse (5 ml, 75x12 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilme	Amersham, Freiburg
Rotrand Sterilfilter, 0,2 µm	Schleicher und Schuell, Dassel

Saekem LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Sequi-Blot PVDF (Polyvinylidene Fluoride )-Membran	BioRad, München
Silylated Objektträger (Aldehyde)	TeleChem, Sunnyvale, USA
Spritzen (5 ml, 10 ml, 25 ml)	B. Braun, Melsungen
Square Well Block	Macherey & Nagel, Düren
TaqMan Universal PCR Universal Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Turbo-Blotter GB-Set	Schleicher und Schuell, Dassel
Wizard Neutralisierungslösung	Promega, Mannheim
Wizard SV96 DNA Bindeplatte	Promega, Mannheim
Wizard Waschlösung	Promega, Mannheim
Yeast tRNA (Lyophilized)	Invitrogen, Leek, Holland
Zellkulturschalen (Ø 40 mm, 60 mm, 100 mm, 150 mm)	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Corning, Bodenheim

## 2. Methoden

### 2.1 Auswahl der Klone

Alle verwendeten I.M.A.G.E.-Klone wurden vom RZPD bestellt. Bei der Auswahl der Klone wurde darauf geachtet, dass das gesuchte Genfragment sich am 3'-Ende des Gens befindet, da bei der reversen Transkription zuerst das 3'-Ende revers transkribiert wird (oligo(dT) Primer) und die Sequenzen sich hier am meisten unterscheiden. Ein weiteres Auswahlkriterium war die Genfragmentlänge (ca. 600 bp lang) und die Übereinstimmung der angegebenen Sequenz mit der repräsentativen Sequenz des Gens (mindestens 96 %) (Abb. 16). Da etwa 20% der beim RZPD erhältlichen Klone nicht das richtige Genfragment enthalten, wurden alle Klone sowohl 5'-endig als auch 3'-endig sequenziert.

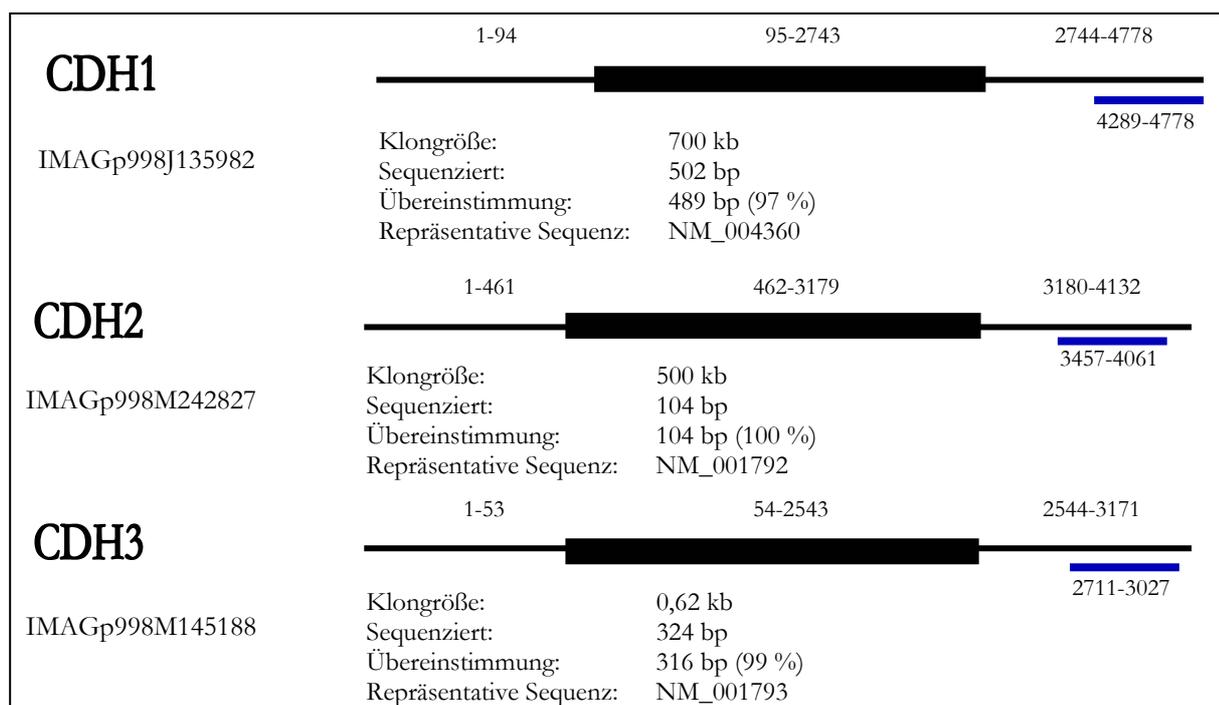


Abb. 16: Klonauswahl

In schwarz dargestellt ist das 5' Ende, der kodierende Bereich (dicker Balken) und das 3' Ende von den Genen CDH1, 2 und 3 und die jeweilige Länge. In blau markiert ist der Genbereich des bestellten Genfragmentes und der Bereich der Übereinstimmung zur repräsentativen Sequenz. Des Weiteren ist die Größe der Kloninsertionen, die Länge des vom RZPD sequenzierten Bereichs als auch die Übereinstimmung mit der repräsentativen Sequenz angegeben. Die Klonbezeichnungen sind unterhalb des Gens angegeben (z.B. für CDH1 IMAGp998J135982).

## 2.2 Anzucht von E.coli

Die I.M.A.G.E.-Klone wurden für 16 Stunden bei 37 °C in 5 ml (für die Sequenzierungen) oder in 96er Square Blöcken mit je 2 ml (für die PCR) in LB-Kulturmedium angezogen. Je nach Resistenzgen der jeweiligen Klone wurde Ampicillin, Kanamycin oder Tetracyclin (je 50 µg/ml) zugesetzt.

## 2.3 Plasmidaufreinigung im kleinen Maßstab („Mini-Präp“)

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

Das über Säulen gereinigte DNA-Sediment wurde abschließend in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst. Die DNA-Konzentration konnte durch Messung eines Absorptionsspektrums zwischen 200 bis 300 nm bestimmt werden, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt.

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

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

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

## 2.4 Sequenzierung der I.M.A.G.E.-Klone

Um die Richtigkeit der beim RZPD bestellten I.M.A.G.E.-Klone zu überprüfen, wurde eine Sequenzanalyse (Sequenzierung durch Kettenabbruch nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977)) der zuvor isolierten Plasmide (siehe Kapitel 2.3) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind unter „Material“ angegeben.

Cycle-PCR:

Volumen	Komponenten
4 µl	Premix
0,5 µl	Primer [20 pmol]
1 µl	DMSO
8-14,5 µl	Template (10 -100 ng PCR-Produkt)
20 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

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

96 °C	10 sek	} 25 Zyklen
55 - 60 °C	5 sek	
60 °C	4 min	
4 °C	andauernd	

Nach der Cycle-PCR wurden die Proben mit Hilfe eines DyeEx™ Spin Kits über Säulen aufgereinigt und anschließend in einer Vakuum-Zentrifuge eingetrocknet. Die Proben wurden vor dem Sequenzieren in 3 µl Ladepuffer (50 mg/ml Blue Dextran in 25 mM EDTA, pH 8,0, im Verhältnis 1:5 mit deionisiertem Formamid gemischt) aufgenommen, 5 min bei 95°C denaturiert und 2 µl davon auf das Sequenziergel geladen.

Sequenziergel (Page plus):

Volumen	Komponenten
5 ml	Page plus
10 ml	5 x TBE
18 g	Harnstoff
18 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
300 µl	10% Ammoniumpersulfat (APS)
15 µl	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)

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

## 2.5 Plasmidaufreinigung im Hochdurchsatz Verfahren

Von den im 96er „Squareblocks“ angezogenen Bakterien (siehe Kapitel 2.2) wurden je 40 µl Bakterienkultur in 96er Platten überführt und mit 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt. Die Platte wurde mit adhäsiver PCR Abdeckfolie versiegelt und sieben Minuten bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte zehn Minuten bei 4500 rpm zentrifugiert, der DNA-haltige Überstand in eine neue 96er Platte überführt und bei -20°C aufbewahrt.

## 2.6 Amplifikation der cDNA-Insertionen der I.M.A.G.E.-Klone durch PCR

Die cDNA-Inserts in den Plasmiden wurden mit Hilfe der PCR (Polymerasen-Kettenreaktion (Mullis and Faloona, 1987)) amplifiziert. Die Primer enthielten an ihrem 5'-Ende jeweils eine 5' C6-Aminolinker Gruppe. Die PCR-Reaktionen erfolgten in 96er Platten mit je 100 µl Reaktionsvolumen je Ansatz im Multi Cycler (96er).

**Der Reaktionsansatz für 96 PCR-Reaktionen a 100 µl:**

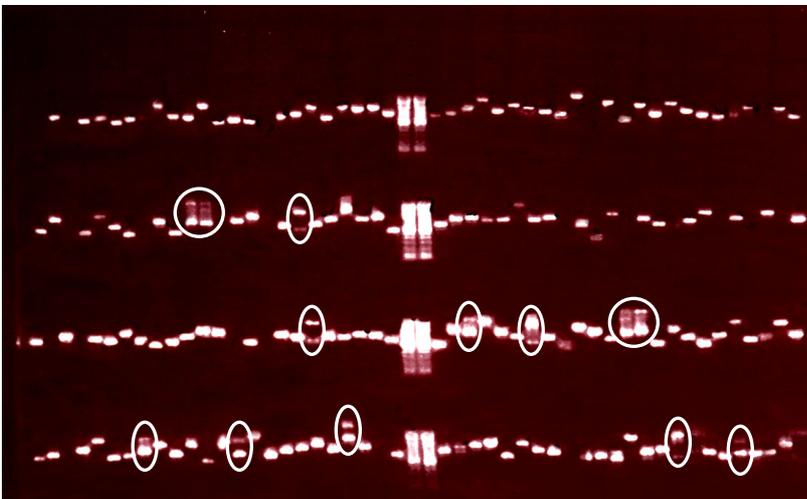
Reagenz (Konzentrationsangaben)	Volumen	Endkonzentration
dNTPs (10 mM)	200 µl	0,2 mM
Uni <sub>fw</sub> (25 µM)	200 µl	0,5 µM
Uni <sub>rev</sub> (25 µM)	200 µl	0,5 µM
5 x PCR-Puffer	2000 µl	1 x
Formamid	200 µl	0,02 %
Taq Polymerase (5 U/µl)	50 µl	0,025 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	7150 µl	---
Total	10000 µl	

In jedes Well wurden noch 10 µl Template DNA (Plasmid-DNA) pipettiert.

Das Cycler-Programm sah folgendermaßen aus:

95 °C	7 min	} 40 Zyklen
95 °C	30 sek	
55 - 60 °C	1 min	
60 °C	2 min	
4 °C	andauernd	

Anschließend wurden die 600-2000 bp langen PCR-Produkte mittels eines einprozentigen Agarosegels aufgetrennt. Die für Hochdurchsatz ausgelegte Gelkammer ermöglichte die gleichzeitige Auftrennung von 288 (3 x 96er PCR-Platten) PCRs in einem Durchlauf. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte über eine Färbung in einer Ethidiumbromidlösung (50µg/ml) und anschließender Detektion auf einem UV-Transilluminator, der über ein Videosystem die Dokumentation der Gele erlaubte. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 100 V für ca. 1 ½ Stunden.



**Abb. 17: PCR-Produkte zweier 96er PCR-Platten auf einem 1 %igem Gel**

Dargestellt sind 186 aufgetragene PCR-Produkte aus zwei 96er PCR-Platten. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte zur Detektion von Kontaminationen (Doppelbanden). Die PCR-Produkte mit Kontaminationen (hier in weißen Ellipsen markiert) wurden nicht für die Mikroarrays verwendet. Jeweils in der Mitte befand sich in zwei nebeneinander liegenden Spuren der Marker.

## 2.7 Aufreinigung und Vermessung der PCR-Fragmente



**Abb. 18: Pipetierroboter Biomek 2000.**

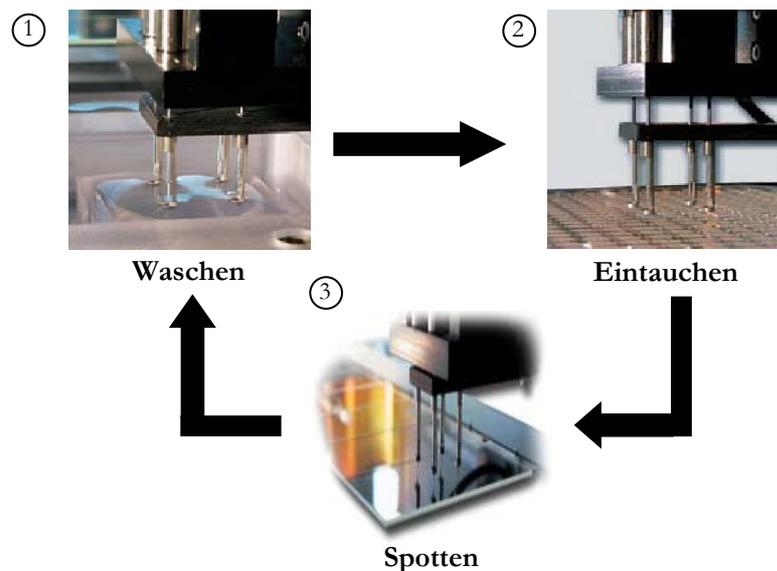
Durch den Pipetierroboter Biomek 2000 wurde das PCR Produkt gepoolt und aufgereinigt.

Das Aufreinigen der PCRs erfolgte ebenfalls im 96er Hochdurchsatz Format mittels des Pipetierrobotersystems Biomek 2000 (Abb.18). Das PCR-Produkt aus zwei 96er PCR-Platten wurde von dem Pipetierroboter auf eine „Multiscreen 96er Filtrationsplatte“ gepoolt und durch eine integrierte Vakuumstation von Salzen, dNTPs und Primern getrennt. Durch mehrmaliges Resuspendieren und Filtrieren mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> wurde das PCR-Produkt noch weiter aufgereinigt. Im letzten Schritt wurde das PCR-Produkt in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf eine photooptische 96er Platte pipettiert. Die DNA-Konzentration des

aufgereinigten PCR-Produkts wurde dann mittels eines 96er Spektrophotometers vermessen und zur Qualitätskontrolle nochmals auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen.

## 2.8 Herstellung der Mikroarrays

Die aufgereinigten PCR-Fragmente wurden in einer „Vakuum Zentrifuge (96er)“ eingedampft und anschließend über Nacht in 50 %  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ /50 % DMSO gelöst und in 384er Platten umpipettiert. Der Spotprozess erfolgte mit dem Affymetrix 417 Arrayer. Der Affymetrix 417 Arrayer funktioniert nach der „Pin-and-Ring<sup>TM</sup>“ Technologie (Abb. 19). Der Ring taucht in ein 96er Well mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ / DMSO gelöster DNA ein und aufgrund der Oberflächenspannung behält der Ring ein Aliquot der DNA. Um ein Teil dieser DNA auf die Glasobjektträger zu transferieren gleitet der Pin durch den DNA/DMSO Film im Ring und berührt die Oberfläche des Objektträgers. Somit wird eine Menge von ca. 200 pl ( $\sim 75$  fg) der DNA auf die Glasoberfläche gebracht. Anschließend wird das „Pin-and-Ring-System“ in einer Waschstation mehrmals mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen und in Vakuum getrocknet. Es können bis zu 42 Mikroarrays in einem Prozess (Dauer ca. 24 Stunden) hergestellt werden. Die Spotgröße beträgt im Durchschnitt  $125 \mu\text{m}$  und der Abstand der Pins voneinander 9 mm.



**Abb. 19: Spotting-Prozess mit dem Affymetrix 417 Arrayer**

- Die vier Pins und Ringe werden in der Waschstation gereinigt.
- Die vier Pins und Ringe tauchen in vier Wells mit 50%  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ /50% DMSO gelöster DNA ein.
- Der „Pin-and-Ring“-Kopf bewegt sich zu den Glasobjektträgern, wo die Pins einen Mikrotropfen (ca. 200 pl) von jeder Probe auf die Glasoberfläche bringen.

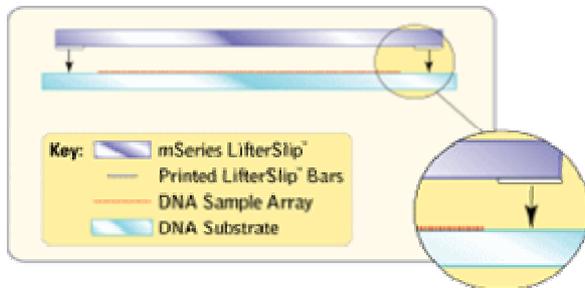
Die Schritte 1-3 wiederholen sich bis alle Proben auf die Glasoberfläche gespottet sind.

## 2.9 Waschen und Prähybridisieren der aldehydbeschichteten Objektträger

Die „gespotteten“ Objektträger wurden drei Tage bei Raumtemperatur luftgetrocknet und dann zur dauerhaften Lagerung in Argonatmosphäre eingeschweißt. Vor der Hybridisierung wurden die Objektträger zur Entfernung von Staub und Taq-Polymerase mehreren Waschrufen unterzogen. Die ersten zwei Waschrufen wurden mit 0,2 % SDS je zwei Minuten und die nächsten zwei Waschrufen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  je zwei Minuten durchgeführt. Um die DNA zu denaturieren, wurden die aldehydbeschichteten Objektträger für zwei Minuten in siedendheißes  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  inkubiert und daraufhin, um „unspezifische“ Stellen abzusättigen, in einer Natriumborhydridlösung (0,65 g  $\text{NaBH}_4$ ,

200 ml 1 x PBS und 65 ml EtOH) für 15 Minuten inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit 0,2% SDS für je eine Minute und zwei Waschschriffen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  für ebenfalls je eine Minute. Danach wurden die Objektträger eine Stunde in Mikroarray Prähybridisierungspuffer inkubiert und eine Minute mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen.

## 2.10 Hybridisierung der aldehydbeschichteten Objektträger



**Abb. 20: LifterSlips**

Die LifterSlips haben eine Stärke von einem Millimeter und zwei Schienen an den Rändern. Dies gewährleistet eine einfache Injektion der Hybridisierungslösung und ein gleichbleibendes Hybridisierungsvolumen.

Die Hybridisierung der in 2.9 vorbereiteten Objektträger erfolgte mit der direkt oder indirekt markierten und denaturierten cDNA (2.15.2 und 2.15.3). Der Bereich des Objektträgers mit den gespotteten PCR-Produkten wurde mit „LifterSlips“ (Abb. 20) bedeckt und die markierte cDNA direkt vor dem „LifterSlip“ pipettiert. Aufgrund von Kapillarkräften wird die markierte cDNA in den 1 mm hohen Spalt hineingezogen und kann mit dem gespotteten PCR-Produkt hybridisieren. Die beiden Enden des LifterSlip wurden mit Fixogum-Kleber abgedichtet und in Hybridisierungskammern 16 Stunden bei 42°C inkubiert. Der

Fixogum-Kleber wurde dann abgezogen und der Objektträger fünf Minuten in 0,5 x SSC und 0,01 % SDS gewaschen. Danach folgten ein Waschschriff mit 0,05 x SSC und 0,01 % SDS für fünf Minuten und ein Waschschriff mit 0,05 SSC für zwei Minuten. Die Objektträger wurden anschließend in 50 ml-Reaktionsgefäßen bei 1000 rpm für drei Minuten trocken zentrifugiert und anschließend mit dem Affymetrix 418 Scanner photooptisch analysiert. Um eine statistisch verwertbare Aussage machen zu können wurden für jedes Experiment vier Mikroarrays hybridisiert, zwei davon mit „Color Flip“ (Cy3 und Cy5 Färbung für Probe und Referenz sind hierbei umgekehrt).

## 2.11 Scannen der Mikroarrays

Das Scannen erfolgte mit dem Affymetrix 418 Scanner, der mit zwei Lasern ausgestattet ist (Emmission 532 nm (Cy3) und 635 nm (Cy5)). Während zum Scannen der Mikroarrays immer 100% Laserpower für beide Farbkanäle verwendet wurde, wurden jeweils mehrere Scans mit unterschiedlichen Photomultiplier Einstellungen für beide Emmissionen durchgeführt. Es wurde anschließend jeweils ein Scanbild für jede Emmission so ausgewählt, dass sich die Intensitäten der einzelnen Gene in etwa entsprechen und keiner der Pixel sich im gesättigten Bereich befindet. Da sich die Signalintensitäten in beiden Kanälen in der Regel immer unterscheiden (Cy3 Nukleotide werden besser während der cDNA Synthese eingebaut, war die Signalintensität im 532 nm Kanal immer höher war als im 635 nm Kanal) wurden immer höhere Photomultiplier Werte beim Scannen im 635 Kanals verwendet. Die ausgewählten Scanbilder für die 532 und 635 Emmission wurden gespeichert und zur Weiterbearbeitung in das Programm Array importiert.

## 2.12 Auswertung der Mikroarrays

Die Bildanalyse, die Spoterkennung und das manuelle Rasterlegen erfolgte mit dem Softwareprogramm Array-Pro (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Für alle nachfolgenden Analysen wurde der Mittelwert des Signals der einzelnen cDNA-Spots abzüglich des Mittelwertes des lokalen Hintergrundes verwendet. Die cDNA-Spots, die eine unregelmäßige Geometrie, Kratzer, Schmier oder Staubpartikel enthielten, wurden markiert und für die weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Datennormalisierung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Michael Mader, Dr. Jan Budczies (Institut für Bioinformatik der GSF) und Herrn Raju Tomer (Department of Biochemical Engineering and Biotechnology in New Dehli) durchgeführt. Dabei wurden alle Genexpressionsverhältnisse des Mikroarrays logarithmisch transformiert und die Vektoren aus jeweils vier Mikroarrays kombiniert mit der Matrix aus allen Messungen (2304 Messungen/Mikroarray für die erste Mikroarray Produktion und 2688 Messungen/Mikroarray für die zweite Mikroarray Produktion). Fehlende Messpunkte wurden mit dem Transcan Algorithmus behandelt (Little and Rubin, 1987). Die Rohdaten wurden erst nichtlinear normalisiert (basierend auf Loess smoother (Cleveland, 1979; Cleveland *et al.*, 1992)) und daraufhin mit der „median absolute deviation“-Normalisierung weiterverarbeitet. Die Grundannahme der linearen und der loess Normalisierungen ist, dass die meisten Gene nicht differentiell exprimiert sind und sich die Anzahl aller herauf- und herabregulierten Gene in etwa identisch ist. Dies ist bei einer großen Anzahl von gespotteten Genen in der Regel gültig. So sind bei einem Mikroarray, der das gesamte Genom abdeckt, in der Regel maximal nur 20-30 Prozent der Gene überhaupt exprimiert und auch die nicht exprimierten Gene werden bei der Normalisierung berücksichtigt. Die Anzahl der gespotteten Gene auf den hier verwendeten Mikroarrays ist mit 1025 ist für diese Grundannahme, dass die Anzahl aller herauf- und herabregulierten Gene in etwa identisch ist, ausreichend. Es gibt als alternative Möglichkeit linear über Spikes oder Housekeeping Gene zu normalisieren. Die Gefahr bei der Normalisierung über Spikes ist, dass kleine Pipetierfehler hierbei einen großen Einfluß auf das gesamte Genexpressionsprofil haben können (Spikes werden artifiziell bei der cDNA Synthese zugegeben). Bei den Housekeeping Genen besteht die Gefahr, dass sie ebenfalls reguliert sein können und damit ebenfalls das Genexpressionsprofil falsch beeinflussen können. Auf dem in dieser Arbeit hergestellten Mikroarray befinden sich drei Housekeepinggene (Ubiquitin, GAPDH und Riboprotein) in Form von mindestens 30 Replikaten.

Als letzter Schritt wurde, um die Daten der Mikroarrays untereinander vergleichen zu können, eine lineare Skalierung zwischen den Mikroarrays durchgeführt.

## 2.13 Kultivierung eukaryotischer Zellen

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

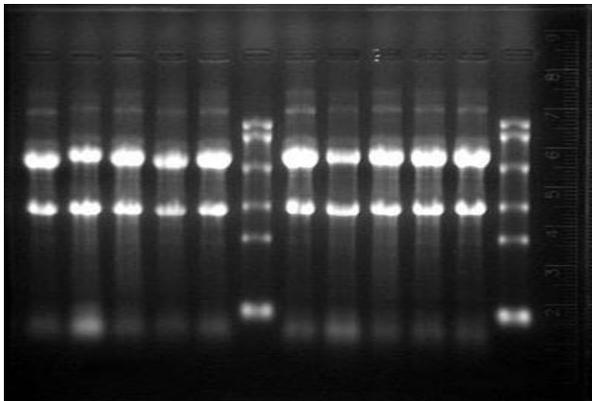
Aminoglykosid G418 tragen, überleben nur die transfizierten Zellen. Für die MDA-MB-435S Zellen, die mit siRNA transfiziert waren, wurde noch zusätzlich 2 µg Puromycin je ml Medium zugegeben. Alle weiteren Zellen (siehe Kapitel 1.5) wurden mit dem entsprechenden Medium nach derselben Methodik kultiviert.

#### Einfrieren von Zellen:

2 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden in Schalen (Ø 15 cm) ausgelegt und unter Standardkulturbedingungen bis zu 80 prozentiger Konfluenz kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>), wurden die Zellen mit je 0,5 ml Trypsin/EDTA für 5 min im Brutschrank abgelöst, in 10 ml Vollmedium aufgenommen und für 5 min bei 310g (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 3 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden auf 4 Einfrier Röhrchen aufgeteilt, 1 h auf Eis inkubiert und bei -80°C eingefroren. Nach ca. 24 Stunden wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff (-186°C) überführt.

## 2.14 Isolierung von RNA aus Zellen

Zur Herstellung von RNA aus eukaryotischen Zellen wurde 5 ml Trizol auf eine zu 80 % konfluenten Zellkulturschale (Ø 15 cm) gegeben und das so gewonnene Zellysate in ein 15 ml-Reaktionsgefäße überführt. Das Zellysate wurde eine Minute mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurde 1 ml Chloroform gegeben und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte bei 4000 rpm für 15 Minuten bei 4°C. Die obere, RNA haltige Phase, wurde in 2 ml Reaktionsgefäße aufteilt, mit 1 Vol. Isopropanol gemischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der



Ansatz wurde für 15 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, 2 ml gekühltes 70% EtOH zugegeben und der Ansatz nochmals für 5 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde luftgetrocknet und in DEPC-Wasser gelöst. Zur Überprüfung der Integrität der RNA wurden von allen isolierten RNAs 10 µg RNA über ein MOPS Gel bei 60 V gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### **Abb. 21: RNA Integrität**

Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung von 10 µg gesamt RNA je Zelllinie auf einem MOPS Gel. Jede Zelllinie ist zweimal aufgetragen, da die RNA in diesem Fall anschließend auf zwei Membranen für nachfolgende Northernblotanalysen gebロットet wurde. Die RNA zeigt nahe zu keinerlei Degradierungserscheinungen. Links und in der Mitte befindet sich ein RNA-Marker.

1 = D8; 2 = D370A, 3 = D9; 4 = MDA; 5 = WT; M = Marker

## 2.15 Einsatz von Kontrollgenen

Sowohl um die unterschiedliche Inkorporationseffizienzen bei der Markierung mit fluoreszenzmarkierten dNTPs (Cy5 dCTPs werden aufgrund ihrer Größe schlechter als Cy3 dCTPs in die cDNA eingebaut), als auch die Sensitivität des Mikroarrays zu bestimmen, wurden zehn Kontrollgene („Spikes“) in unterschiedlichen Konzentrationen für die Cy3- und die Cy5-Markierungs-Reaktionsansätze eingesetzt (Tab. 1). Die komplementären Sonden hierzu sind in mehreren Replikaten auf den Mikroarrays vorhanden. So kann z.B. mit dem Kontrollgen 1 oder dem

Kontrollgen 10 festgestellt werden, ob 0,01 ng RNA noch in dem jeweiligen Cy-Kanal detektiert werden kann, oder ob das Verhältnissen von Kontrollgen 3 exakt revers zu dem Verhältnis des Kontrollgen 8 ist. Bei den Kontrollgenen handelt es sich um einzelnen mRNAs aus *A. thaliana*. Als Negativkontrolle wurden Poly(dA)<sub>40–60</sub> Oligonucleotide, Lachs Sperma DNA und humane Cot-1 DNA auf dem Mikroarray transferiert. Als Positivkontrolle wurden in drei Ecken jedes Blocks „Housekeeping“ Gene (Ubiquitin, Riboprotein und GAPDH) eingesetzt.

Kontrollgen	Cy3	Cy5	Verhältnis (Cy3/Cy5)
1	1,28 ng	0,01 ng	128,00
2	0,64 ng	0,02 ng	32,00
3	0,32 ng	0,04 ng	8,00
4	0,16 ng	0,08 ng	2,00
5	0,16 ng	0,16 ng	1,00
6	0,08 ng	0,08 ng	1,00
7	0,08 ng	0,32 ng	0,25
8	0,04 ng	0,32 ng	0,13
9	0,02 ng	0,64 ng	0,03
10	0,01 ng	1,28 ng	0,01

Tab. 1: Eingesetzte mRNA-Quantitäten der Kontrollgene und die daraus resultierenden Verhältnisse

## 2.16 Reverse Transkription

### 2.16.1 cDNA Synthese

Für die reverse Transkription zur cDNA-Synthese wurde Superscript II Transkriptase von Life Technologies nach den Herstellerangaben verwendet. Es wurden für die quantitative realtime RT PCR 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt, deren Integrität zuvor auf einem MOPS-Gel überprüft wurde. Als Primer wurden sowohl Zufalls-Hexamer Primer als auch Oligo(dT) Primer verwendet.

### 2.16.2 Aminoallyl markierte cDNA-Synthese und Hybridisierungsvorbereitung

Diese Methode wurde für die indirekte Markierung verwendet. Hierbei wurden Aminoallyl markierte dUTP bei der cDNA-Synthese mit eingebaut und anschließend Cy3 bzw. Cy5 an die so modifizierte cDNA gekoppelt. Es wurden 10-20 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zur modifizierten cDNA-Synthese wurde der „FairPlay microarray labelling kit“ nach Herstellerangaben (Stratagene) verwendet. Zu jedem Cy3 oder Cy5 markierten cDNA-Ansatz wurde vor der Hybridisierung 10 µg human Cot-1 DNA, 8 µg poly d(A)<sub>40-60</sub> and 1 µl of 5 µg/µl Hefe tRNA zugefügt. Die Cy3 und Cy5 gekoppelten cDNAs wurden anschließend gepoolt und 3 µl 20 x SSC und 0,5 µl 10 % SDS zugegeben, so dass das Endvolumen 20 µl betrug. Der cDNA Mix wurde vor der Hybridisierung zwei Minuten auf 99°C erhitzt und dann 20 Minuten bei 45 °C inkubiert.

### 2.16.3 Cy3/Cy5 markierte cDNA Synthese und Hybridisierungsvorbereitung

Diese Methode wurde für die direkte Markierung verwendet. Hierbei wurden Cy3- and Cy5-dCTPs direkt bei der cDNA-Synthese eingebaut. Es wurden für die cDNA-Synthese 40-100 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Es wurde hierzu

der „LabelStar Kit“ von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Für jede Hybridisierung wurden cDNAs mit Cy3 und Cy5 markiert (z.B. Experiment and Kontrolle), zusammengeführt und 10 µg human Cot-1 DNA, 8 µg poly d(A)<sub>40-60</sub> and 1 µl of 5 µg/µl Hefe-tRNA zugegeben. Der Gesamtansatz wurde in einem Konzentrator eingedampft, vor der Hybridisierung in 20 µl Mikroarray Hybridisierungspuffer (siehe Kapitel 1.10) für 30 Minuten bei 60°C inkubiert und dann bei 95°C für fünf Minuten denaturiert.

## 2.17 Northern Blot Analyse

Zur Validierung der Mikroarray Ergebnisse wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Für jede Zelllinie wurde 10 µg RNA (in 6 µl DEPC Wasser gelöst) zusammen mit 14 µl Ladepuffer (Sigma) zehn Minuten bei 65 °C inkubiert und kurz auf Eis abgekühlt. Die RNA wurde drei Stunde gelelektrophoretisch bei 60 V auf dem Mops gel nach Größe aufgetrennt. Danach wurde das Mops gel in DEPC-Wasser gewaschen, eine in 10x SSC angefeuchtete Membran luftblasenfrei aufgelegt und im „Turbo-Blotter“ (Schleicher und Schüll) 16 Stunden bei Raumtemperatur geblottet. Die Membran wurde bei 42 °C in einer Hybridisierungsröhre mit Northern Hybridisierungspuffer und 500 µg Lachs Sperma DNA (zuvor für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt) 2 Stunden prähybridisiert.

Zwischenzeitlich wurden 5 µl DNA-Sonde (25-50 ng) und 37 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> in das bereits mit Randomprimer, dNTPs und Puffer bestücktem Reaktionsgefäß pipettiert, bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abkühlt. Es wurden 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP und 2 µl Magenta Polymerase zu in den Ansatz gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die markierte DNA wurde dann über Mikrospin Säulen aufgereinigt, für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Membran wurde mit der radioaktiv markierten DNA über Nacht in 5 ml Northern Hybridisierungspuffer bei 42 °C hybridisiert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Membranen zweimal in 2 x SSC-Puffer und einmal in 2 x SSC/0.1% SDS bei 60 °C zehn Minuten gewaschen. Zur Detektion der Banden wurden Röntgenfilme in unterschiedlichen Zeitabständen (zwei Minuten bis sieben Tage) aufgelegt. Die Filme wurden eingescannt und mit dem Programm ScionImage (Version Beta 4.0.2, Scion Corporation) densitometrisch ausgewertet. Zum Strippen der Filter wurden die Membranen für fünf Minuten bei 100°C in 1 % SDS und eine Minute mit 1 x SSC gewaschen.

## 2.18 Quantitative Realtime RT PCR

Quantitative realtime RT PCR Sonden und Primer wurden als „Assay-on-Demand“ von Applied Biosystems für die Gene ARHGEF6, AXIN2, CYR61, FZD7, GAPDH, ITGA3, LAMA4, MMP1, MMP3, MMP7, MMP8, MYC, MXI1, PTN, SNAI2, SPARC, TGFBR3, TIMP3 und VEGFC bestellt. Für CDH1, SLUG, SNAIL1, SIP1, TWIST, ZEB1, E12/E47 Primer und Sonden wurden mittels der Software Primer Express (Applied Biosystems) ausgewählt. Dabei wurden folgende Parameter beachtet:

### Primerauswahl:

- Die Länge des Amplikons liegt zwischen 50-150 Basenpaare.
- Beide Primer sind 18-30 Nukleotide lang.
- Die Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) liegt zwischen 58 und 60°C.

- Alle vier Basen sind gleichmäßig verteilt (20-80 % G/C Inhalt), und längere Sequenzen mit dem gleichen Nukleotid (insbesondere von mehr als vier G) sind vermieden worden.
- Das letzte Nukleotid an dem 3'Ende ist ein G oder C für eine stärkere Bindung an der Primerseite.
- Mindestens ein Primer liegt über eine Exon-Transition, um Amplifikation genomischer DNA auszuschließen.

#### Sondenauswahl:

- Der Hybridisierungsbereich liegt innerhalb des Amplikons so nahe wie möglich an den Primern, ohne mit diesen zu überlappen (nicht mehr als 60 Basenpaare Abstand von den Primerenden).
- Die Sonde ist 20 – 30 Nukleotide lang (maximal 35 Nukleotide).
- Die Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) liegt bei 68 – 70°C (5-10°C > Primer T<sub>m</sub>).
- Alle vier Basen sind gleichmäßig verteilt (50% G/C Inhalt) und längere Sequenzen mit dem gleichen Nukleotid (insbesondere von mehr als vier G) sind vermieden worden.
- Das letzte Nukleotid am 5'Ende darf kein G sein, da der Quenching Effekt einer G Base auch nach dem Schneiden der Sonde noch vorhanden ist.

Alle Primer and Sonden wurden nach möglichen Dimerformationen und sekundären Strukturen über Computersimulationen getestet.

Quantitative realtime RT PCR Analysen wurden auf dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System durchgeführt. Die Sequenzen der PCR-Primerpaare und den Fluoreszenzsonden sind in folgender Tabelle gezeigt (Sonden wurden von PE Applied Biosystems bestellt):

Oligo	Lokalisation in. Bezug auf Gen Bank Acc. Nu.	Sequenz 5' – 3'	Größe des PCR-Produkts	T <sub>m</sub> (°C)
VP E-Cadherin	1765	5'-GAACAGCACGTACACAGCCCT-3'	76 bp	59
RP E-Cadherin	1841	5'-GCAGAAGTGTCCCTGTTCCAG-3'		58
S E-Cadherin	1787	5'-ATCATAGCTACAGACAATGGTTCTCCAGTTGCT-3'		67
VP SIP1	1250	5'-GCGGCATATGGTGACACACAA-3'	80 bp	59
RP SIP1	13030	5'-CATTTGAACCTGCGATTACCTGC-3'		58
S SIP1	1279	5'-CAGATCAGCACCAAATGCTAACCCAAGG-3'		69
VP SNAIL1	131	5'-TGCAGGACTCTAATCCAAGTTTACC-3'	71 bp	59
RP SNAIL1	202	5'-GTGGGATGGCTGCCAGC-3'		60
S SNAIL1	158	5'-TCCAGCAGCCCTACACCAGGCC-3'		68
VP TWIST	674	5'-TGTCCGCGTCCCCTAGC-3'	92 bp	9
RP TWIST	766	5'-TGTCCATTTTCTCTTCTCTGGA-3'		59
S TWIST	712	5'-TCAGCAGGGCCGGAGACCTAGATGT-3'		69
VP E12/E47	1820	5'-CGGTCATCCTGAACTGGAGC-3'	82 bp	61
RP E12/E47	1902	5'-TTCCTCTTCTCGCCGTTTCAA-3'		61
S E12/E47	1849	5'-CGAGAGCGGAACCTGAATCCCAAAGC-3'		71
VP ZEB	221	5'-TGTTACCAGGGAGGAGCAGTG-3'	74 bp	59
RP ZEB	295	5'-CTTGCCCTTCCTTTCTGTATC-3'		59
S ZEB	243	5'-AAGAGAAGGGAATGCTAAGAAGCTGCTGGGA-3'		68

**Tab. 2: Sequenzen der Quantitativen Realtime RT Primer und Sonden**  
Vorwärtsprimer (VP), Rückwärtsprimer (RP), Sonde (S)

Das Prinzip der Quantitativen Realtime RT PCR ist von Gibson und Heid (Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996) beschrieben worden. Für die Quantitative Realtime RT PCR wurden 5 µl cDNA, 10 µl TaqMan PCR Universal Master Mix, 300 nmol von der Sonde und 300 nmol Primer verwendet (Endvolumen war 20 µl). Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 50 °C (ermöglicht Uracil N-glycosylase zu schneiden), erfolgte eine zehnmünütige

Inkubationszeit um die AmpliTaq Gold zu aktivieren. Jeder der 40 Zyklen bestand aus 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C und Hybridisierung mit Sonden und Primern für eine Minute bei 60 °C.

## 2.19 Amplifikation eines E-Cadherin Promotor-SNP an Position -160

Für die Amplifikation des SNPs im E-Cadherin Promoter an Position -160 wurden 50 ng Tumor-DNA in die PCR eingesetzt.

Folgender Ansatz wurde pro 50 µl PCR-Reaktion verwendet:

Reagenz (Konzentrationsangaben)	Volumen	Endkonzentration
dNTPs (2 mM)	8 µl	0,32 mM
E-cad S1 (25 µM)	1 µl	0,5 µM
E-cad S2 (25 µM)	1 µl	0,5 µM
10 x PCR-Puffer (10 mM MgCl)	5 µl	1 x
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	0,05 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	32,5µl	---
Total	50 µl	

In jede Reaktion wurden noch 2 µl DNA (~50ng) pipettiert.

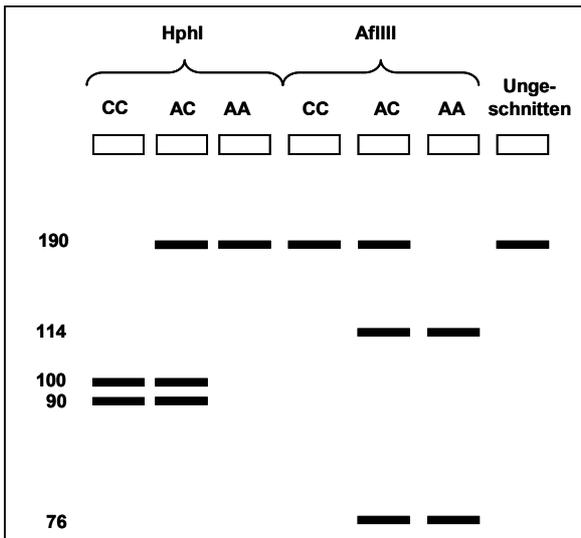
Das Cyclor-Programm für die SNP-PCR:

94 °C	7 min	} 40 Zyklen
95 °C	30 sek	
55 - 60 °C	1 min	
60 °C	2 min	
72°C	5 min	
4 °C	andauernd	

Anschließend wurden die 190 bp langen PCR-Produkte des proximalen Promotors mittels eines zweiprozentigen Agarosegels aufgetrennt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte über eine Färbung in einer Ethidiumbromidlösung (50µg/ml) und anschließender Detektion auf einem UV-Transilluminator, der über ein Videosystem die Dokumentation der Gele erlaubte. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 60 V. Das Aufreinigen der PCR-Produkte erfolgte über den PCR-Aufreinigungskit von Qiagen (nach Angaben des Herstellers). Die Konzentration des aufgereinigten PCR-Produkt wurde mit dem UV/Vis Spektrophotometer DU® 530 vermessen.

## 2.20 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Die RFLP-Analyse wurde abgewandelt nach Li (Li *et al.*, 2000) durchgeführt. Es wurde ein 190 bp langes Fragment aus dem Promotorbereich des E-Cadherins amplifiziert (siehe Kapitel 2.18). Das PCR-Produkt wurde entweder mit HphI oder AflIII 12 Stunden inkubiert und über ein vierprozentiges Agarosegel bei 60 V aufgetrennt. Das C-Allel enthielt eine HphI-Schnittstelle und das A-Allel eine AflIII-Schnittstelle. Der Verdau mit HphI führt zu zwei Fragmenten von 90 bp und 100 bp. Hingegen führt der Verdau mit AflIII zu einem 76 bp- und 114 bp-Fragment.

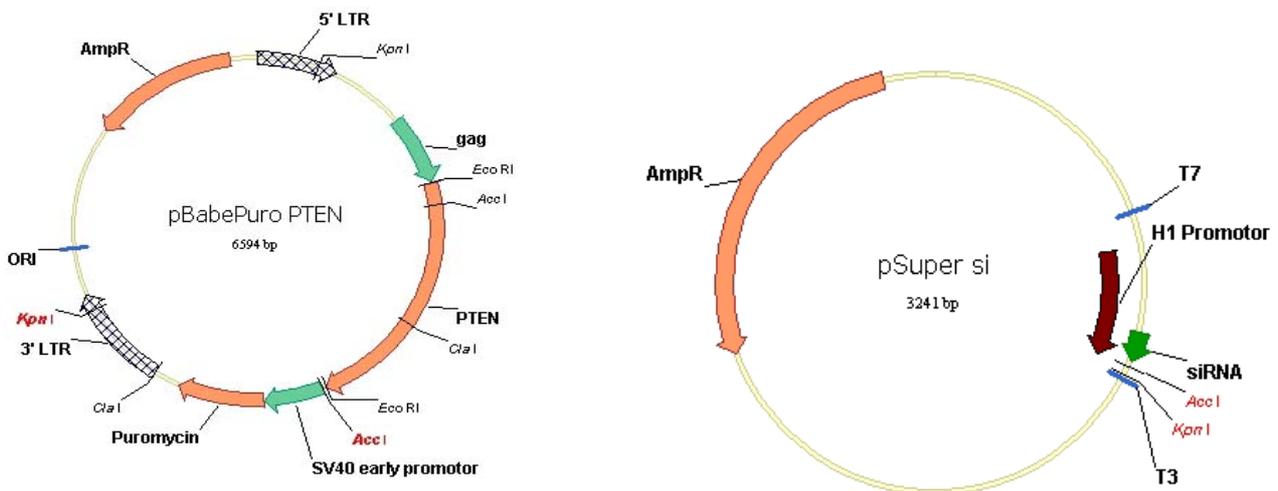


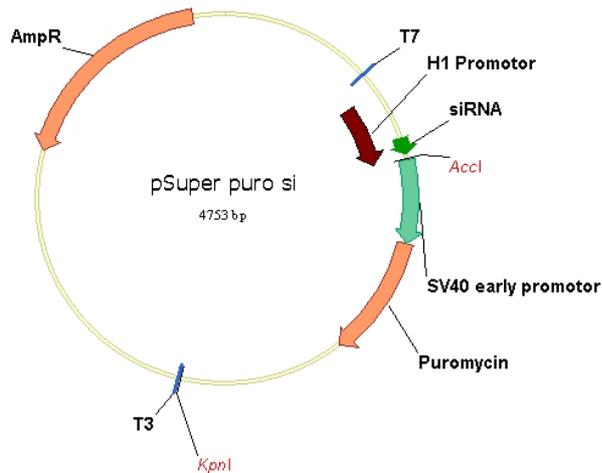
**Abb. 22: RFLP-Analyse**

Dargestellt sind Restriktionsverdauungen des 190 bp langen amplifizierten Promotorbereich von homozygot AA, heterozygot AC und homozygot CC mit AfIII und HphI in gelelektrophoretischer Ansicht. AfIII schneidet das A-Allel und HphI das C-Allel.

## 2.21 Klonierung des Puromycinresistenzgens in pSuper siRNA Vektoren

Zur Untersuchung des Einflusses von CYR61 und E-Cadherin auf die Expression bestimmter Wundheilungsgene wurden uns verschiedene siRNAs in pSuper-Vektor von Herrn Dr. Truss zur Verfügung gestellt. Da diese keine eukaryontische Resistenzgene enthielten, wurde eine Puromycinresistenz einkloniert (die mit E-Cadherin Konstrukten transfizierten MDA-MB-435S Zellen enthielten bereits eine Resistenz gegen Geneticin). Das Resistenzgen wurde mit den Enzymen ACCI und KPNI aus dem Vektor pBabePuro PTEN ausgeschnitten und in die verschiedenen pSuper-Vektoren (CYR61-31, CYR61-52, CYR61-72 und CDH1-94) ligiert.





**Abb. 23: Herausschneiden und Ligieren der Puromycinresistenz aus pBabePuro PTEN in pSuper si**

Das Puromycinresistenzgen wurde mit den Enzymen ACCI und KPNI aus dem Vektor pBabePuro PTEN ausgeschnitten und in pSuper-Vektoren mit unterschiedlichen siRNA Inserts ligiert.

## 2.22 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

MDA-MB-435S Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenz JetPEI mit pSuper siRNA-Konstrukten (CYR61-31, CYR61-52, CYR61-72 und CDH1-94) stabil transfiziert. Hierfür wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen in 12 Wells in Vollmedium für einen Tag kultiviert. Die DNA (1,5  $\mu\text{g}$ ) und JetPEI (3,5  $\mu\text{l}$ ) wurden separat in 150  $\mu\text{l}$  150 mmol NaCl gelöst. Die JetPEI/NaCl-Lösung wurde dann zur DNA/NaCl Lösung pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit OPTIMEM-Medium und dem DNA/JetPEI-Gemisch über Nacht im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und wieder Vollmedium zu den Zellen gegeben. Am dritten Tag nach der Transfektion wurden die transfizierten MDA-MB-435S Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, in Vollmedium (+2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Puromycin zur Selektion) aufgenommen und in 6 Well überführt. Da in dem pSuper-Vektor ein Puromycin-Resistenzgen kloniert wurde (siehe Kapitel 2.20), überlebten nur die transfizierte Zellen. Als Kontrolle wurden MDA-MB-435S Zellen ebenfalls mit EGFP-Vektor transfiziert und anhand der Fluoreszenz die Transfektionsrate bestimmt.

## 2.23 Selektion mit DynaBeads

Die mit dem Vektorsystem pSuper transfizierten MDA-MB-435S (D8, D370A, WT)-Zellen wurden unter Verwendung des „CELLlection Pan Mouse IgG Kits“ und eines Anti-E-Cadherin AK (SHE-78 Antikörper) auf positive, E-Cadherin-exprimierende Zellen selektioniert

### DynaBeads mit SHE-1 AK beladen:

20  $\mu\text{l}$  DynaBeads (=  $4 \times 10^7$  Beads) wurden einmal mit 1 ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) unter Verwendung eines Magnetständers gewaschen und in 400  $\mu\text{l}$  PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) aufgenommen. Nach Zugabe von 0,4  $\mu\text{g}$  AK (HECD-1), welcher gegen E-Cadherin gerichtet ist, erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, wodurch der AK über einen DNA-Linker an die Beads binden konnte. Die mit dem AK-beladenen Beads wurden dreimal mit je 1 ml WP gewaschen und im Ausgangsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  Waschpuffer aufgenommen.

Selektion auf E-Cadherin-positive Zellen:

MDA-MB-435S (D8, D370A, WT) Zellen wurden zweimal mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen, mit Versen abgelöst und in je 10 ml Vollmedium aufgenommen. Je  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in 15 ml Reaktionsröhrchen überführt, 4 min bei 310g sedimentiert und zweimal mit je 1 ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Das Zellsediment wurde in 1 ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  AK-beladenen DynaBeads erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$ , um die Bindung der E-Cadherin positiven Zellen an den AK zu ermöglichen. Unter Verwendung eines Magnetständers wurden die negativen Zellen von den positiven, an die Beads gebundenen Zellen, getrennt und verworfen. Die positiven Zellen wurden dreimal mit je 1 ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen, in 400  $\mu\text{l}$  Vollmedium ( $37^\circ\text{C}$ ) aufgenommen. Die positiven, E-Cadherin exprimierende Zellen wurden je in eine Gewebekulturschale mit Vollmedium überführt und die Einzelklone unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert.

## 2.24 Diff-Quick-Färbung zur Dokumentation der Zelldichte

Eukaryontische Zellen, die in unterschiedlichen Dichten in  $\varnothing$  150 mm Zellkulturschalen ausgesät wurden, wurden mittels Diff-Quick Reagenzien fixiert und angefärbt. Die Zellen wurden dabei einmal mit PBS gewaschen und dann 5 Minuten mit 2 ml der methanolhaltigen Fixierlösung auf die Zellkulturschale fixiert. Die Fixierlösung wurde abgesaugt und die Zellkulturschale für 5 Minuten mit der ersten Färbelösung und dann mit der zweiten Färbelösung inkubiert. Zuletzt wurde die überschüssige Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}$  entfernt.

## 2.25 Herstellung von Protein-Lysaten aus eukaryotischen Zellen

<b>Lysispuffer:</b>	140 mM	NaCl
	4,7 mM	KCl
	0,7 mM	$\text{MgSO}_4$
	1,2 mM	$\text{CaCl}_2$
	1 mM	Hepes, pH 7,4
	1 % (v/v)	Triton X-100
	2 mM	PMSF
	20 $\mu\text{g}$ / ml	Leupeptin
	19 $\mu\text{g}$ / ml	Aprotinin
	100 mM	NaF
	2 mM	$\text{Na}_3\text{VO}_4$
	10 mM	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$

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

## 2.26 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Biorad-Proteinreagenz (Biorad) durchgeführt. Die Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine und die damit verbundene Blaufärbung, die zur Proteinkonzentration proportional ist. 5 µl Zellysat wurden mit 995 µl Biorad Reagenz, welches im Verhältnis 1:5 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt wurde, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Biorad Reagenz enthält neben Coomassie Brilliant Blue G-250 Phosphorsäure und Methanol. Die Blaufärbung wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem UV/Vis Spektrophotometer DU® 530 (Beckmann) gemessen und die Proteinmenge anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve quantifiziert.

## 2.27 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Proteinauftrennung wurden Vertikalgele (SDS-PAGE nach (Laemmli, 1970), die aus einem 5%igen Sammelgel und einem 7,5%igen, 10%igen oder 12,5%igen Trenngel bestanden, hergestellt. Die Zellysate (20 µg) wurden in Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei 80-120 V in einer Minigelapparatur bei Raumtemperatur durchgeführt.

	Sammelgel		Trenngel	
	5%	7,5%	10%	12,5%
H <sub>2</sub> O	2,85 ml	8,3 ml	7,34 ml	6,4 ml
Tris/HCl, pH 6,8	1,25 ml	---	---	---
Tris/HCl, pH 8,8	---	3,74 ml	3,74 ml	3,74 ml
40% Acrylamid	0,63 ml	2,8ml	3,75 ml	4,69 ml
20% SDS	25 µl	75 µl	75 µl	75 µl
10% APS	40 µl	90 µl	90 µl	90 µl
TEMED	4 µl	9 µl	9 µl	9 µl

## 2.28 Western Blot Analysen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden für 1 h bei 100 V in einer Nassblotkammer auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen transferiert. Freie Bindungsstellen der Membran wurden mit einer Blocklösung (Mmp3- und Vegfc-AK: 5% Magermilchpulver in TBST; Cyr61: 0.1% Tween, 20, 2% Pferdeserum, 2,5% BSA, 2,5% Magermilchpulver in PBS) für 2-3 h bei 4°C abgesättigt. Der jeweilige Primärantikörper wurde in der Blocklösung (bei Cyr61-AK in 0.1% Tween 20, 1%, Pferde Serum, 1% Magermilchpulver in PBS) verdünnt und die Membran darin ÜN bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde der in der Blocklösung verdünnte Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper zugegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBST (bei Cyr61-AK mit 10 mM Tris pH7.5, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% Triton-

X-100, 1%, Pferdeserum, 1% BSA, 1% Magermilchpulver) wurde die Membran mit einem Chemilumineszenzsubstrat für Western Blot Analysen (ECL Western Blotting System) für 1 min inkubiert. Zur Detektion der Banden wurden Röntgenfilme in unterschiedlichen Zeitabständen (1 sek bis ÜN) aufgelegt und anschließend entwickelt. Die Filme wurden eingescannt und mit dem Programm ScionImage (Version Beta 4.0.2, Scion Corporation) densitometrisch ausgewertet.

## 2.29 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

E-Cadherin positive Zellen wurden in einem „Fluorescence-activated Cell Scanner“ (FACS) gemessen. Bei dieser Methode wurde E-Cadherin mit einem primären AK (SHE78-7) erkannt, an dem ein DTAF-markierter sekundärer AK gebunden wurde. Im FACS passieren die Zellen einen Laserstrahl, werden je nach Fluoreszenzintensität durch einen elektrischen Impuls aufgeladen, passieren ein elektrostatisches Feld und werden je nach Ladung abgelenkt, was sich in unterschiedlichen Signalen am Detektor auswirkt.

Für die Versuche wurden die Zellen zweimal mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und mit Versen (0,53 mM EDTA in PBS) von der Gewebekulturschale abgelöst. Nach Aufnahme in 10 ml Vollmedium und Überführung in ein 15 ml Reaktionsröhrchen wurden die Zellen 5 min bei 310g ( $4^{\circ}\text{C}$ ) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 10 ml Vollmedium resuspendiert und die Zellzahl/ml bestimmt. Je FACS-Ansatz wurden  $5 - 7 \times 10^5$  Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, 3 min bei 310g abzentrifugiert und einmal mit 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer (0,1% (w/v) Natriumazid, 0,1% (w/v) BSA) gewaschen. Das Sediment wurde in 50  $\mu\text{l}$  Primärantikörper Lösung (SHE78-7: 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) verdünnt mit Waschpuffer resuspendiert und 45min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit einem DTAF-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (50  $\mu\text{l}$ , verdünnt in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) abgedunkelt auf Eis. Nach zweimaligem Waschen in je 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer wurden die Zellen in 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer resuspendiert und im Durchflusszytometer (FACS EPICS® XL, Beckmann Coulter) gemessen. Die Ergebnisse wurden in das Programm WinMDI (Version 2.8) importiert und dort graphisch dargestellt.

## 2.30 Allgemeine molekularbiologische Methoden

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

## D Ergebnisse

Das Kalzium abhängige, homophile Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin liegt in diffusen Magenkarzinomen in fast 50% der untersuchten Fälle in mutierter Form vor, wobei ein kompletter Verlust des Exons 8 oder des Exons 9 gehäuft und eine Punktmutation im Exon 8 (D370A,) einmal auftraten (Becker *et al.*, 1994). Diese Mutationen sind vor allem in einer so genannten „Hot-Spot-Region“ im E-Cadherin Gen lokalisiert, d.h. die meisten E-Cadherin Mutationen findet man im Bereich des Exons 8 und des Exons 9 (Berx *et al.*, 1998a). Bei den Deletions-Mutationen handelt es sich um „in frame“ Deletionen. In vitro Studien mit humanen MDA-MB-435S Karzinomzellen, die stabil mit WT- bzw. mutiertem E-Cadherin transfiziert worden waren, zeigten einen mutationsabhängigen E-Cadherin Einfluss sowohl auf die Morphologie, als auch auf das Migrationsverhalten der Zellen (Handschuh *et al.*, 1999; Handschuh *et al.*, 2001). WT E-Cadherin exprimierende Zellen zeichneten sich durch einen epithelialen und wenig motilen Phänotyp aus. Die E-Cadherin-Moleküle waren an den Zellkontaktstellen lokalisiert. Im Gegensatz zur Expression von WT E-Cadherin führte die Expression von mutiertem E-Cadherin zum Teil morphologisch zu einer epithelialen zu mesenchymalen Transition, wobei die Zelladhäsion abnahm und die Motilität der Zellen anstieg. Mutiertes E-Cadherin war an den Zellrändern und verstärkt perinukleär lokalisiert. Von Handschuh *et al.* durchgeführte in vitro Wundheilungsversuche zeigten, dass sich einige der Zellen, die mutiertes E-Cadherin exprimierten, im Vergleich zu WT E-Cadherin exprimierenden Zellen durch ein erhöhtes Migrationsverhalten auszeichnen. Das Ziel dieser Arbeit ist, basierend auf die Ergebnisse von Handschuh *et al.*, das Auffinden und Charakterisieren von Kandidaten Genen, die aufgrund des E-Cadherin-Status unterschiedlich exprimiert sind. Hierzu wurde ein cDNA Mikroarray entwickelt und erfolgreich etabliert, der das Untersuchen von ca. tausend Genen in einem einzigen Experiment ermöglicht.

## 1 Etablierung der Mikroarray Methodik

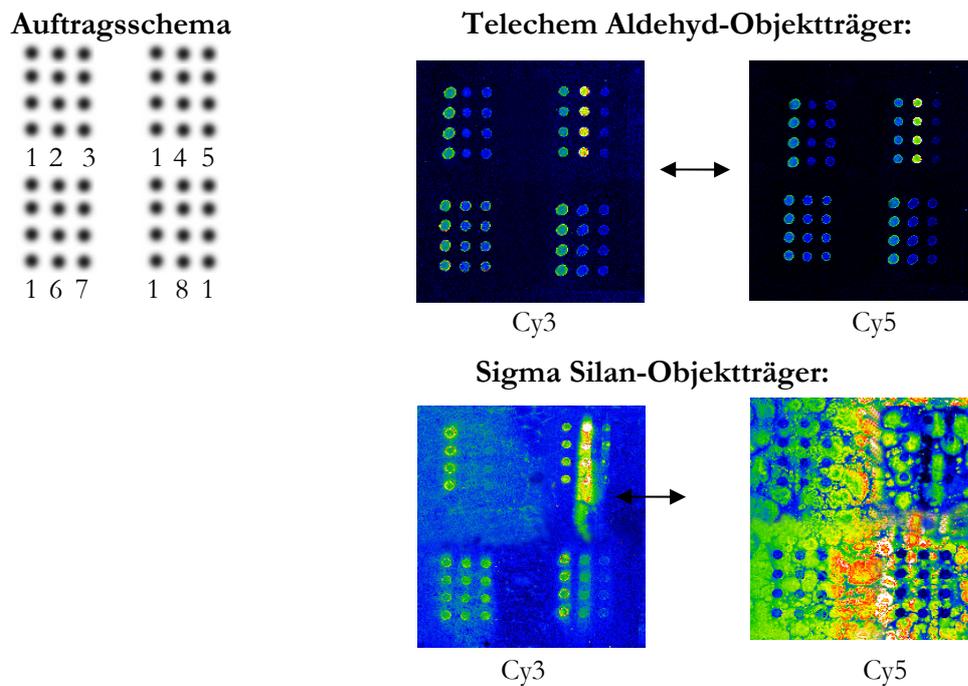
### 1.1 Austesten von unterschiedlich beschichteten Mikroarray Objektträgern

Es gibt eine große Auswahl an unterschiedlich beschichteten Glasobjektträgern, auf die PCR-Sonden gespottet werden können. Diese unterscheiden sich, abhängig vom jeweiligen Spotroboter und des verwendeten Spotting Puffers, im Bezug auf die Spotmorphologie und -homologie, die DNA-Bindekapazität und den Objektträgerhintergrund. Zum Auffinden eines geeigneten Objektträgers für den hier verwendeten Affymetrix 417 Arrayer wurden folgende Objektträger und Spotting Puffer getestet:

- Sigma Silan Objektträger
- Corning Aminosilan Objektträger
- Sigma Polylysin Objektträger
- TeleChem Aldehyd Objektträger

Die aufgereinigten PCR-Produkte des Housekeeping Genes Ubiquitin und der zufällig ausgewählten Gene IGF2, WAF1, Sprouty2, MDR1, FREAK, JAG und H19 wurden in drei unterschiedlichen Spotting Puffern gelöst (H<sub>2</sub>O/DMSO 1:1, 3 x SSC-Puffer bzw. Arrayit Micro Spotting Solution Plus) und auf unterschiedlichen

Glasoberflächen gespottet. Anschließend wurden die Objektträger mit Cy3- und Cy5- markierter cDNA der Zelllinie Granta-519 hybridisiert. Die Ergebnisse waren für jeden Objektträger sehr unterschiedlich. Während als ein Extremfall der Sigma Silan Objektträger einen sehr hohen Hintergrund im Cy5-Kanal hatte, zeigte der Telechem Aldehyd Objektträger als einziger Objektträger fast keinen Hintergrund (Abb. 24). Die Spotmorphologie und -homologie war in erster Linie von dem verwendeten Spotting Puffer abhängig. So waren auf dem Telechem Aldehyd Objektträger die Spots mit 3 x SSC deutlich kleiner als die mit DMSO und die Spots mit der Arrayit Micro Spotting Solution Plus zeigten sog. „Donutstrukturen“.



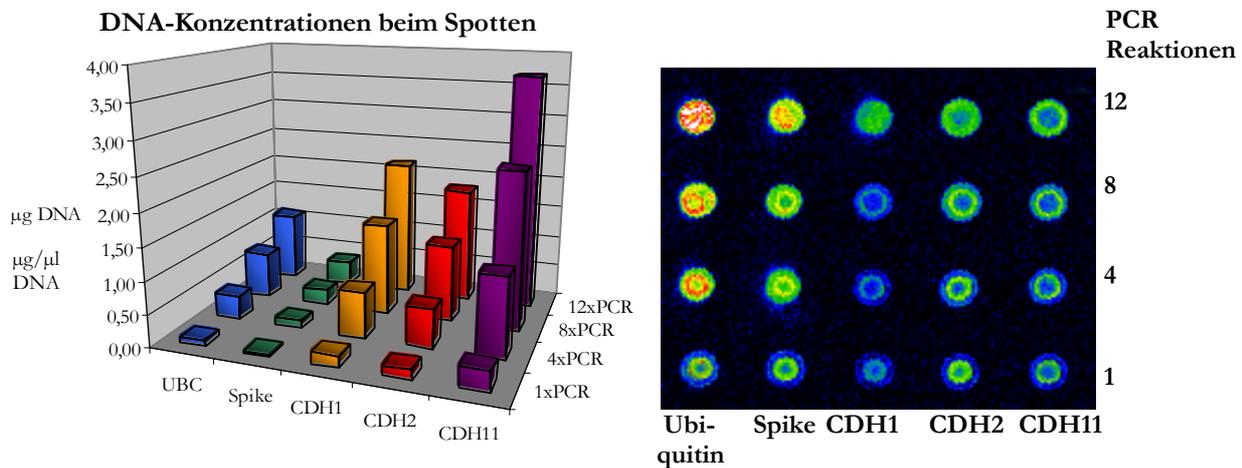
**Abb. 24: Beschichtete Objektträgeraustattung**

Dargestellt ist die Hybridisierung von Telechem Aldehyd Objektträger und Sigma Silan Objektträger mit Cy3- und Cy5 markierter cDNA aus der Zelllinie Granta-519. Während beim Telechem Aldehyd Objektträger sowohl im Cy3- als auch im Cy5-Kanal kein die Auswertung störender Hintergrund vorhanden ist und die Spots weitgehend homogen mit leichter "Donutstruktur" waren, zeigt der SigmaSilan Objektträger einen höheren Hintergrund bei dem Cy3-Kanal und einige der Spots lösten sich von dem Objektträger (Reihe 4). Bei dem Cy5-Kanal findet eine unspezifische Bindung von den Cy5-dCTPs an die Silanoberfläche statt. Der Hintergrund ist höher als das Signal der Spots. Als Spottingpuffer wurde H<sub>2</sub>O/DMSO 1:1 verwendet. 1: Ubiquitin 2: IGF2 3: WAF1 4: Sprouty2 5: MDR1 6: FREAK 7: JAG 8: H19

Für die Hybridisierungen mit den Zelllinien D8, D370A, D9 und MDA und die Kontrollversuche wurden die Mikroarray Experimente mit dem Telechem Aldehyd Objektträger und dem 50 %igen DMSO Spottingpuffer durchgeführt.

Die DNA-Konzentration der Sonden ist ebenfalls ein wichtiger Faktor, da z.B. eine zu niedrige DNA Konzentration zu einer schwächeren Sensitivität der Mikroarrays führt. Um eine geeignete DNA-Menge zu bestimmen, wurden vier unterschiedliche DNA-Konzentrationen eingesetzt. Hierzu wurden 25 PCR Reaktionen für das Housekeeping Gen Ubiquitin und der Cadheringene CDH1, CDH2 und CDH11 durchgeführt, aufgereinigt und vermessen. Aliquots aus den aufgereinigten PCR-Produkten, die 1, 4, 8 und 12 PCR Reaktionen entsprachen, wurden ebenso wie ein kommerziell erworbenes *Arabidopsis* Kontrollgen (Stratagene) in vier Konzentrationen verwendet. Die in H<sub>2</sub>O/DMSO 1:1 gelösten PCR-Produkte wurden auf Telechem Aldehyd Objektträger gespottet und mit markierter cDNA aus der Zelllinie GRANTA-519 hybridisiert. Der Markierungsreaktion wurden 10 ng eines *Arabidopsis* Kontrollgenes (Spike) zugegeben. Die jeweils gemessenen DNA-Konzentrationen für jedes Gen

können der Abb. 25 (links) entnommen werden. In der rechten Abbildung sind die unterschiedlichen Intensitäten der einzelnen Spots im Cy5 Kanal dargestellt. Die Spotintensität nimmt von oben (entspricht 12 PCR Reaktionen) nach unten (entspricht 1 PCR Reaktion) bei allen fünf Genen ab. Es ist auch bei den jeweils niedrigsten DNA-Konzentrationen (Ubiquitin 0,09  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; *Arabidopsis* Kontrollgen 0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; CDH1: 0,18  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; CDH2: 0,15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und CDH11 0,31  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ein auswertbares Signal vorhanden. Anhand des *Arabidopsis* Kontrollgenes (Spike) wurde festgestellt, dass mit 0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gespotteter Sonde noch 10 ng mRNA eines Gens sensitiv detektierbar ist. Um zu gewährleisten, dass schwach exprimierte Gene (<10 ng je 50  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA) noch auswertbare Signale geben, wurde für alle Mikroarray Produktionen mindestens 0,375  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA eingesetzt. Dies entspricht dem 3,75fachen der PCR-Konzentration, die z.B. von Stratagene für ihre PCR-Produkte empfohlen wird, und ist damit ausreichend für die Detektion von schwach exprimierten Genen. Da die Gene unterschiedlich stark exprimiert sind, ist kein Zusammenhang zwischen PCR-Produkt und Signalstärke erkennbar (Abb. 25). So ist z.B. das „Housekeeping Gen“ Ubiquitin deutlich stärker exprimiert als z.B. CDH1 und zeigte somit auch ein deutlich stärkeres Signal bei allen vier PCR-Konzentrationen als CDH1.



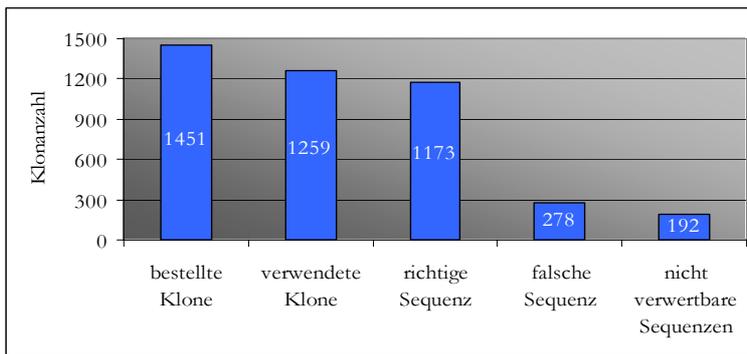
**Abb. 25: Bestimmung der geeigneten DNA-Konzentration für die Herstellung der Mikroarrays**

Es wurden vier verschiedene PCR-Konzentrationen für die Gene Ubiquitin, CDH1, CDH2, CDH11 und ein *Arabidopsis* Kontrollgen ausgetestet. Links sind die jeweils eingesetzten Konzentrationen dargestellt und rechts die Signal der auf aldehydbeschichtete Objektträger gespotteten PCR-Produkte nach der Hybridisierung mit der Zelllinie GRANTA-519. Je heller der Spot ist, umso stärker ist das Signal.

## 1.2 Sequenzierung und unterschiedliche PCR-Aufreinigungstechniken

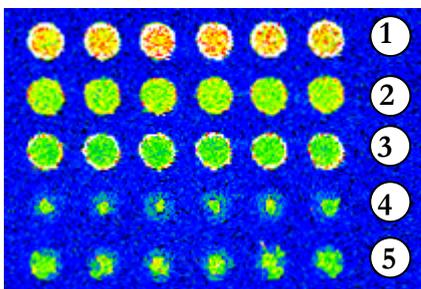
1451 IMAGE-Klone wurden insgesamt für den Mikroarray vom RZPD bestellt und anschließend durch Sequenzierung an verschiedenen Instituten der GSF Neuherberg verifiziert. 355 der Klone stammen aus den Bereichen Adhäsion, WNT- und MAPKinase Signalweg und wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl von der 5`- als auch von der 3`-Seite sequenziert, da das RZPD nicht die Richtigkeit der Sequenzinformationen der Klone garantiert. Die Sequenzierungen der 1451 Klone ergaben, dass 81% der Klone die richtige Sequenzinformation und 19% der Klone nicht die erwartete Sequenz enthielten (Abb. 26). 13% der „falschen“ Klone enthielten repetitive Sequenzen oder nicht humane Sequenzen, die nicht für die Mikroarray Herstellung verwendet wurden. Die restlichen 6% der IMAGE-Klone enthielten nicht das gewünschte DNA Insertion, hatten aber

Sequenzinformationen für ein anderes humanes Gen und wurden für die Herstellung der Mikroarrays verwendet. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Abb. 26 gezeigt.



**Abb. 26: Sequenzierung der IMAGE-Klone**  
Es wurden 1451 IMAGE-Klone (100%) vom RZPD bezogen und sequenziert. Für den Mikroarray wurden davon 1259 Klone (87 %) verwendet, 192 Klone (13 %) waren aufgrund der Sequenz (repetitive Sequenzen oder nicht humane Sequenzen) nicht verwertbar. 278 der IMAGE-Klone (19 %) hatten nicht die bestellten DNA Inserts, aber 86 davon (6 %) enthielten Sequenzen für andere humane Gene und wurden für den Mikroarray verwendet.

Zum Auffinden einer geeigneten Aufreinigungsmethodik wurden 5 unterschiedliche PCR Aufreinigungen getestet. Hierzu wurden 200 µl PCR-Produkt des Gens Ubiquitin zusammengeführt und jeweils 1/5 des zusammengeführten PCR-Produkts für jede Aufreinigungsmethode verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels „PCR-Purification Kit“ (Qiagen), „Multiscreen-PCR 96er Filtrationssystem“ (Millipore), Isopropanolfällung, „Wizard® SV 96 Binding Plates“ (Promega) und „Wizard® SV 96 Binding Plates“ (Promega) mit anschließender Isopropanolfällung aufgereinigt, in H<sub>2</sub>O/DMSO 1:1 gelöst, auf Telechem Aldehyd Objektträger gespottet und dann mit markierter cDNA der Zelllinie GRANTA hybridisiert. Das beste Resultat ergab die Aufreinigung mit dem „PCR-Purification Kit“ (Qiagen). Die Spotsmorphologie war homogen und die Quantität des aufgereinigten PCR-Produkts war am höchsten (oberste Spotreihe in Abb. 27). Ein ähnliches Bild ergab die Aufreinigung mit „Multiscreen-PCR 96er Filtrationssystem“ (Millipore). Hier war die Intensität der Spots etwas niedriger als durch die Aufreinigung mit dem „PCR-Purification Kit“, aber die Spots waren ebenfalls homogen. Die Spots nach der Isopropanol Aufreinigung zeigten hingegen leichte „Donutstrukturen“. Nicht verwendbar waren die Spots der PCR-Produkte, die mit „Wizard® SV 96 Binding Plates“ oder „Wizard® SV 96 Binding Plates“ mit anschließender Isopropanolfällung aufgereinigt wurden. Die Spots waren nach Aufreinigung mit „Wizard® SV 96 Binding Plates“ klein und zusammengezogen und beim Ansatz mit anschließender Isopropanolfällung waren die Spots zusätzlich noch inhomogen. Für alle weiteren Mikroarray Produktionen wurde das „Multiscreen-PCR 96er Filtrationssystem“ verwendet, da dieses mit dem Pipettierroboter Biomek 2000 automatisiert werden konnte.



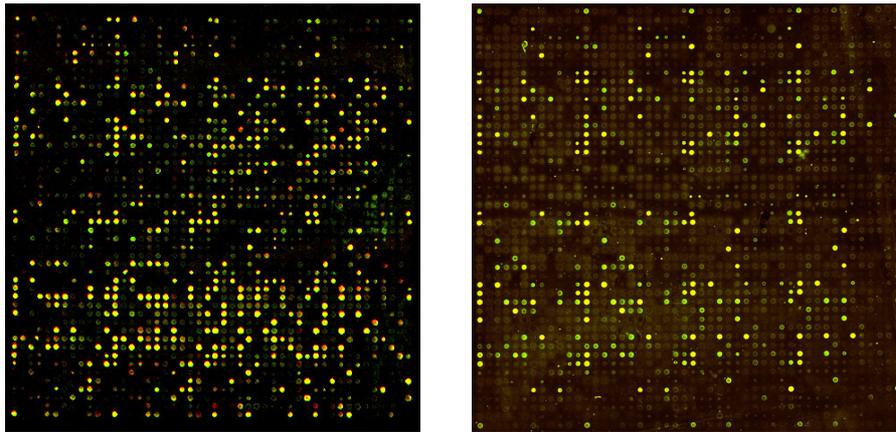
**Abb. 27: Spotsmorphologie nach verschiedenen PCR-Aufreinigungsmethoden**

Die unterschiedlichen PCR Aufreinigungsmethode sind jeweils in einer horizontalen Reihe dargestellt. Es wurden PCR-Produkte des Gens Ubiquitin verwendet und mit markierter cDNA der Zelllinie GRANTA hybridisiert. Senkrecht sind die einzelnen Aufreinigungsmethoden dargestellt: 1: „PCR-Purification Kit“; 2: „Multiscreen-PCR 96er Filtrationssystem Plates“; 3: Isopropanolfällung; 4: „Wizard® SV 96 Binding Plates“; 5: „Wizard® SV 96 Binding Plates“ (Promega) mit anschließender Isopropanolfällung

### 1.3 Direkte versus indirekte cDNA Markierung

Es gibt verschiedene Methoden der cDNA Markierung, wobei die direkte und die indirekte Markierung die am häufigsten verwendeten Methoden sind. Um festzustellen, welche der beiden Markierungsmethoden mit dem hier verwendeten Mikroarray die besten Resultate ergibt, wurden jeweils vier Chips mit entweder direkt oder indirekt markierter cDNA hybridisiert. Für die indirekte Markierung wurden 10 bzw. 20 µg Gesamt-RNA und für die direkte

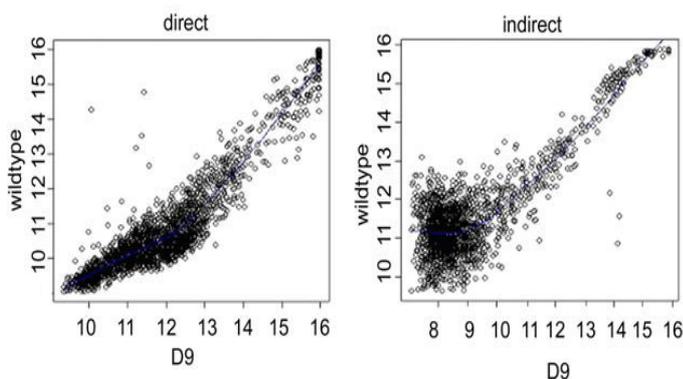
Markierung 50  $\mu\text{g}$  RNA aus den Zelllinien MDA-MB 435S WT und D9 verwendet. Die markierten cDNAs wurden, wie in Material und Methoden (Kapitel 2.16) beschrieben, mit dem Mikroarray hybridisiert. Es ist erkennbar, dass die Mikroarrays, die mit der indirekt markierten cDNA (20  $\mu\text{g}$ ) hybridisiert wurden, ein schwächeres Spotsignal bei einem gleichzeitig höheren Hintergrund zeigen als die Mikroarrays, die mit direkt markierter cDNA hybridisiert wurden (Abb. 28). Auch sind die differentiell exprimierte Gene schwieriger detektierbar, da die Cy3/Cy5 Verhältnisse dieser Gene bei der indirekten Markierung um ca. 40% geringer waren als bei der direkten Markierung. Die mit 10  $\mu\text{g}$  der indirekt markierten cDNA hybridisierten Mikroarrays zeigten kaum ein Signal, hatten aber einen ebenso hohen Hintergrund wie die mit 20  $\mu\text{g}$  RNA hybridisierten Mikroarrays.



**Abb. 28: Direkte versus indirekte cDNA Markierung**

Links dargestellt ist ein Mikroarray, der mit direkt markierter cDNA und rechts ein Mikroarray, der mit indirekt markierter cDNA (20  $\mu\text{g}$  RNA) hybridisiert wurde. Bei beiden Mikroarrays sind die Spots bezüglich ihrer Größe und der Spotmorphologie gut auswertbar. Deutlich ist erkennbar, dass der Mikroarray mit der indirekt markierten cDNA einen deutlich höheren Hintergrund bei gleichzeitig schwächerem Signal hat. Differentiell exprimierte Gene, erkennbar an roten bzw. grünen Spots, sind ebenfalls besser bei der direkten Markierung erkennbar.

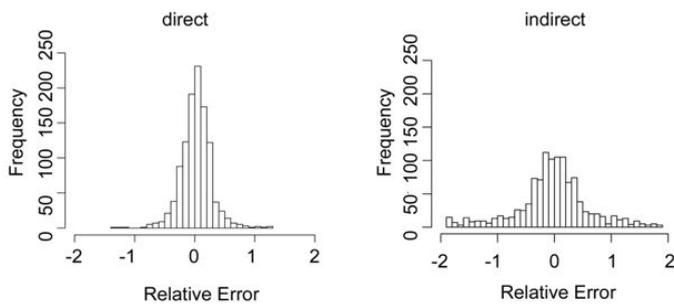
Die direkte cDNA Markierung zeigt eine geringe Varianz und einheitliche Signalintensitäten der Sonden, wie anhand des Scatterplots der Abb. 29 erkennbar ist. Bei der indirekten cDNA Markierung hingegen sind stärkere Abweichungen in der Linearität der Regressionsfunktion zu erkennen. Im Idealfall wird nach der Daten Normalisierung eine Regressionsgerade erwartet. Insbesondere in der Region der schwach exprimierten Gene kommt es bei der indirekten cDNA Markierung zu starken Abweichungen in der Linearität der Regressionsfunktion. Dort ist auch die Varianz am höchsten. Das Verhältnis der Mittelwerte der Varianz beträgt zwischen indirekter und direkter Markierung 1,63, was auf eine höhere Varianz bei der indirekten cDNA Markierung hinweist.



**Abb. 29: Scatterplots**

Dargestellt sind zwei Scatterplots mit normalisierten Expressionswerten. Es sind die normalisierten Expressionswerte von MDA WT (Y-Achse) gegen MDA D9 (X-Achse) aufgetragen. Der linke Scatterplot zeigt die Expressionswerte einer Mikroarray Hybridisierung mit direkt markierter cDNA. Die Werte streuen nur wenig und die Regressionsfunktion entspricht nahezu einer Geraden. Der rechte Scatterplot hingegen stammt aus einer Mikroarray Hybridisierung mit indirekt markierter cDNA, und eine Streuung der Expressionswerte ist bei schwach exprimierten Genen deutlich zu erkennen. Die Regressionsfunktion entspricht eher einer Funktion höherer Ordnung als einer Geraden.

Die erhöhte Varianz bei der indirekten Markierung ist auch bei den Replikaten auf dem Mikroarray nachweisbar. Jedes Gen ist mindestens durch zwei Spots auf jedem Chip repräsentiert und für diese Replikate sind nahezu identische Expressionswerte zu erwarten. Dies war bei der Hybridisierung mit indirekt markierter cDNA nicht der Fall (Abb. 30). Der relative Fehler ist bei der indirekten Markierung für den Großteil der Replikate deutlich höher als bei der direkten Markierung. Der relative Fehler berechnet sich aus der Differenz der zwei Expressionswerte dividiert durch ihren Mittelwert.



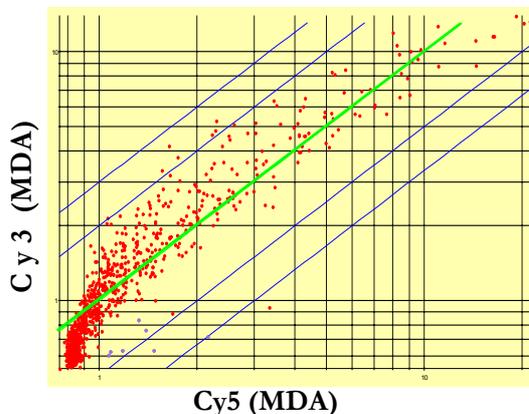
**Abb. 30: Histogramme für den relativen Fehler bei den Replikaten**

Gezeigt sind zwei Histogramme für den relativen Fehler der Mikroarrays, die entweder mit direkt (linkes Histogramm) oder mit indirekt markierter cDNA (rechtes Histogramm) hybridisiert wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass der relative Fehler bei der direkten Markierung geringer ist (hoher Peak um die 0) als bei der indirekten Markierung (der Peak um die 0 ist deutlich kleiner als bei der direkten Markierung, dafür ist die Verteilung deutlich breiter).

Zusammenfassend ist sowohl aus den Mikroarray Bildern als auch den Scatterplot und Histogramme zu entnehmen, dass die direkte Markierung hinsichtlich der Datenqualität der indirekten Markierung überlegen ist. Es wurde für alle weiteren Hybridisierungen die direkte Markierung verwendet.

## 1.4 Reproduzierbarkeit der Mikroarray Daten

Um die Qualität des Mikroarrays zu ermitteln, wurden vier Hybridisierungen mit jeweils Cy3 und Cy5 markierter WT cDNA (sowohl als Probe als auch als Referenz) und vier Hybridisierungen mit jeweils Cy3 und Cy5 markierter MDA cDNA (sowohl als Probe als auch als Referenz) durchgeführt. In Abb. 31 ist ein Scatterplot mit der Hybridisierung Cy3 MDA versus Cy5 MDA dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nur wenige Gene eine differentielle Expression zeigen und nach der Mittelung aller vier Mikroarrays von Cy3 MDA versus Cy5 MDA als auch nach der Mittelung von Cy3 MDA WT versus Cy5 MDA WT konnten keine differentiell exprimierte Gene mehr festgestellt werden. Die Replikate zeigten nur eine geringe Abweichung zueinander. Es waren keine falsch positiven Verhältnisse oder eine größere Streuung der Daten vorhanden.

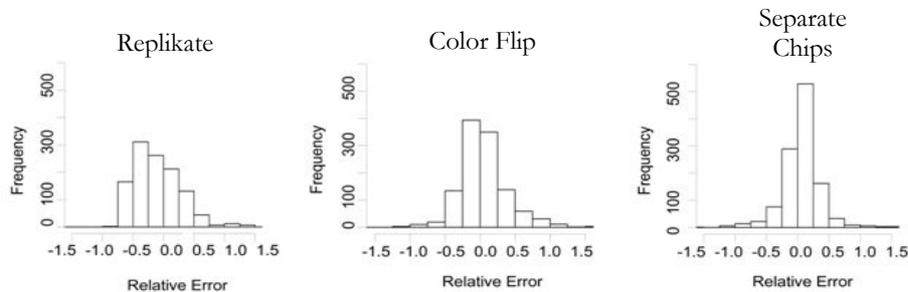


**Abb. 31: Scatterplot einer Kontrollhybridisierung**

Dargestellt ist eine Kontrollhybridisierung (MDA versus MDA). Auf der Abszisse sind die Cy5-Intensitäten und auf der Ordinate die Cy3-Intensitäten logarithmisch dargestellt. Jeder Punkt entspricht dem Expressionswert einer Sonde. Die roten Punkte sind die auswertbaren Spots, die blauen Punkte nicht verwertbare Spots (Spots, die aufgrund von Staub oder Kratzer nicht verwendet wurden). Die grüne Linie entspricht dem Verhältnis 1, die blauen Linien oberhalb der grünen Linie zeigen eine zweifache bzw. vierfache Heraufregulation, die blauen Linien unterhalb der grünen Linie eine zwei bzw. vierfache Herabregulation eines Gens. Bis auf wenige Ausnahmen sind keine differentiell exprimierte Gene oberhalb oder unterhalb der blauen Linie zu erkennen.

Die Histogramme für den relativen Fehler in der Abb. 32 zeigen ebenfalls eine hohe Reproduzierbarkeit der Mikroarray Daten bei den Kontrollhybridisierungen sowohl zwischen den Replikaten als auch beim „Color Flip“

(bezüglich Scannereinstellung und der Inkorporations- und Markierungseffizienz). Der relative Fehler für zwei separate Chips, die mit der gleichen cDNA hybridisiert wurden, ist vergleichbar mit dem relativen Fehler der Replikate. Hingegen ist der relative Fehler bei den „Color Flip“ Experimenten am höchsten, was mit der unterschiedlichen Inkorporationseffizienz durch die reverse Transkriptase und durch nicht „flippende Gene“ (siehe Kapitel 1.5) zu erklären ist.

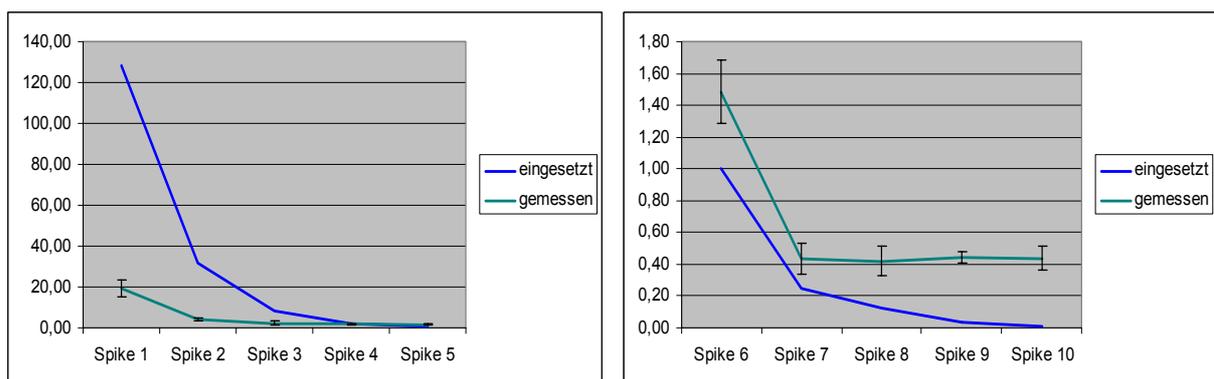


**Abb. 32: Histogramme für den relativen Fehler bei den Replikaten, bei dem „Color Flip“ und bei der Hybridisierung von zwei Chips mit der gleichen cDNA**

Das linke Histogramm zeigt den relativen Fehler für die Replikate auf einem Mikroarray, das mittlere den relativen Fehler für die zwei Farbkanäle (Cy3 und Cy5 Kanal) und das rechte den relativen Fehler für zwei separate Chips, die mit der gleichen cDNA hybridisiert wurden. Es wurden für die Histogramme unnormalisierte Rohwerte verwendet.

### 1.5 Sensitivität des Mikroarrays

Um die Qualität des Mikroarray Spotting Prozesses, die Effizienz der Markierungsreaktion, die Sensitivität und die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Mikroarrays und des „Color Flips“ für jedes Mikroarray Experiment bestimmen zu können, wurden cDNAs von zehn Kontrollgenen, so genannte Spikes, gespottet. Es handelt sich dabei um *Arabidopsis thaliana* Gene. Die zehn dazugehörigen mRNAs wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zur Markierungsreaktion addiert. Die eingesetzten Verdünnungen sind in Material und Methoden (siehe Kapitel C 1.6) beschrieben. Der Vergleich zwischen eingesetztem und gemessenem Verhältnis (Cy3/Cy5) ist in der Abb. 33 dargestellt.



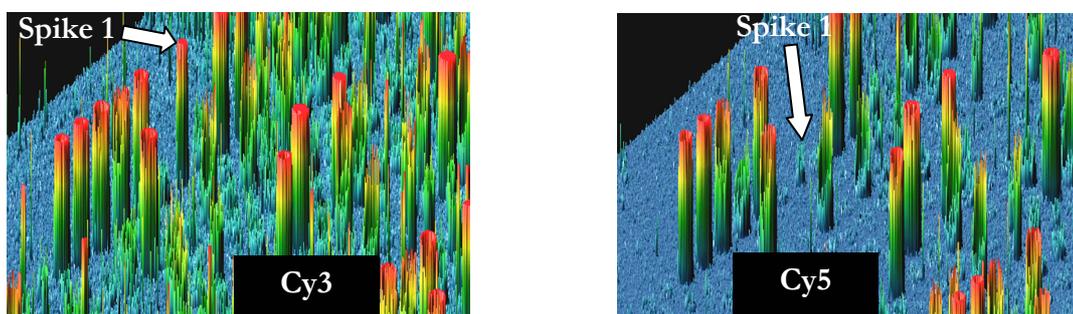
	Spike 1	Spike 2	Spike 3	Spike 4	Spike 5	Spike 6	Spike 7	Spike 8	Spike 9	Spike 10
eingesetzt	128,00	32,00	8,00	2,00	1,00	1,00	0,25	0,13	0,03	0,01
gemessen	19,35	4,28	2,41	1,81	1,54	1,48	0,44	0,42	0,44	0,44

ng

**Abb. 33: Kontrollgene (Spikes)**

Zu den Cy3- und Cy5-Markierungsreaktionen wurden, um den sensitiven Bereich des Mikroarrays zu bestimmen, unterschiedliche Mengen der zehn Kontrollgene zugegeben. Aufgrund der unterschiedlich eingesetzten Mengen ergeben sich die eingesetzten Verhältnisse der Kontrollgene. Nach der Hybridisierung und dem Scannen der Mikroarrays wurden die tatsächlich gemessenen Verhältnisse der Kontrollgene berechnet. Die Daten und Standardabweichungen beziehen sich auf den Mittelwert aus acht Hybridisierungen. Die eingesetzten und gemessenen Verhältnisse sind in den beiden oberen Diagrammen dargestellt (links für Spike 1-5, rechts Spike 6-10). Darunter ist der direkte Vergleich zwischen eingesetztem und gemessenem Verhältnis gezeigt. Es wurde linear normalisiert.

Die gemessenen Verhältnisse bei den Kontrollgenen 4 bis 7 weichen kaum von den eingesetzten Verhältnissen ab. Hingegen konnten insbesondere die größeren Unterschiede bei den Verhältnisse der Kontrollgene 1-3 und 8-10 nicht mehr mittels der Mikroarrays detektiert werden. Bei den Kontrollgenen 1-3 ist das gemessene Verhältnis deutlich geringer und bei den Kontrollgenen 8-10 deutlich höher als das erwartete Verhältnis. Eine Herabregulation kann nur bis zu einem Verhältnis von ca. 0,4 detektiert werden. In Abb. 34 ist eine dreidimensionale Ansicht der Intensität der Expression des Kontrollgens 1 dargestellt. Obwohl das Signal im Cy3-Kanal wie erwartet deutlich höher ist als im Cy5-Kanal (es wurden 1,28 ng des Kontrollgens 1 in der Cy3 Reaktion, in der Cy5 Reaktion hingegen nur 0,01 ng eingesetzt), ist im Cy5-Kanal noch deutlich ein schwaches Signal des Kontrollgens 1 detektierbar. Die Sensitivität des Mikroarray ist somit bei 0,01 ng mRNA noch gegeben. Quantitative Verhältnisse können durch den cDNA Mikroarray nicht bestimmt werden, es können nur Aussagen im Bezug auf die Richtung der differentiellen Expression gemacht werden.



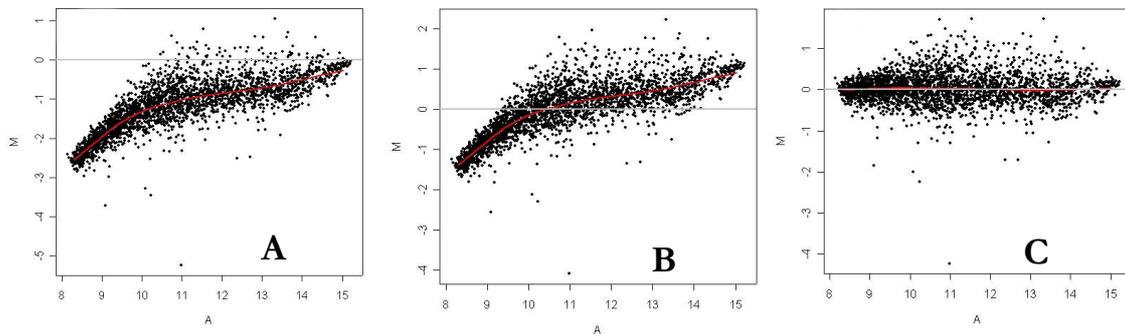
**Abb. 34: Kontrollgen 1 in dreidimensionaler Ansicht**

Dreidimensionale Ansicht der Expression des Kontrollgens 1 im Cy3 und Cy5 Kanal. Jede der Säulen entspricht einem Spot auf dem Mikroarray. Mit einem weißen Pfeil ist der Spike markiert. Es ist deutlich erkennbar, dass das Spikesignal im Cy3-Kanal deutlich höher als im Cy5-Kanal ist, aber 0,01 ng mRNA noch detektierbar sind (das Signal liegt deutlich über dem Hintergrund). Es wurde cDNA der Zelllinie MDA-D9 (Cy3) und MDA-WT (Cy5) hybridisiert.

## 1.6 Normalisierung

Die Normalisierung spielt eine essentielle Rolle um z.B. die unterschiedliche Inkorporationseffizienz der reversen Transkriptase für Cy3- und Cy5- dCTPs (Cy5-Nukleotide werden schlechter als Cy3-Nukleotide durch die reverse Transkriptase eingebaut) als auch unterschiedliche Hybridisierungseffizienzen und unterschiedlich hohe Hintergründe über den Mikroarray herauszurechnen. Es gibt im Wesentlichen zwei Möglichkeiten der Normalisierung: die lineare und die nichtlineare Normalisierung. Die lineare Normalisierung kann über Spikes, über Housekeeping Gene, über den Hintergrund, über die Signale aller oder einer Teilmenge aller auf dem Chip befindlichen Sonden erfolgen. In der Abb. 35 sind M versus A Plots für einen Mikroarray unnormalisiert, linear normalisiert und nichtlinear normalisiert dargestellt. M ist hierbei die Differenz der logarithmischen Expressionswerte und A ist der Mittelwert der Expressionswerte. Bei dem „M versus A Plot“ werden die logarithmischen Verhältnisse auf der Y-Achse ( $M = \log_2(\text{Cy5}/\text{Cy3})$ ) und die Mittelwerte der logarithmischen Intensitäten für den Cy3- und den Cy5- Kanal ( $A = \log_2(\text{Cy5} * \text{Cy3}) / 2$ ) auf der X-Achse aufgetragen. Um herauszufinden, welche Normalisierung für die Mikroarray Experimente am besten geeignet sind, wurden verschiedene Normalisierungsstrategien miteinander verglichen. Exemplarisch wurde die Hybridisierung mit der Zelllinie D257A und WT mit linearer und nicht linearer Normalisierungen ausgewertet. Der linke „M versus A Plot“ zeigt eine unnormalisierte Hybridisierung (Fig. 35A). Da die Inkorporationseffizienz sich zwischen Cy3- und Cy5-Nukleotiden unterscheidet, befinden sich die meisten Datenpunkte unterhalb der Nulllinie und somit sind die meisten Gene herabreguliert detektiert. Um diesen Effekt

auszugleichen, wurde eine lineare Normalisierung durchgeführt (Fig. 35B). Der Summe aller herauf- und herabregulierten Werte beträgt hierbei 0. Es sind aber Unterschiede zwischen schwach und stärker exprimierten Genen erkennbar. So zeigen die schwach regulierten Gene eine Herabregulation (Mittelwert der logarithmierten Expressionswerte 8-10) und stärker exprimierte Gene (Mittelwert der logarithmierten Expressionswerte 13-15) eine Heraufregulation. Um diesen Effekt zu vermeiden, wurden verschiedene nichtlineare Normalisierungen angewendet. Als die am besten geeignete nicht lineare Normalisierung stellte sich die „Loess smoother“ Normalisierung (Cleveland, 1979; Cleveland *et al.*, 1992)) verknüpft mit der "median absolute deviation" Skala Normalisierung heraus. Das Ergebnis ist in Abb. 35C ersichtlich. Die Anzahl der herauf- und herabregulierten Werte ist in etwa identisch und auch die Verhältnislinie korreliert mit der Nulllinie. Für alle Hybridisierungen wurde die nichtlineare „Loess smoother“ Normalisierung gefolgt von einer "median absolute deviation" Skala Normalisierung verwendet.



**Abb. 35: Lineare und nicht lineare Normalisierung**

Dargestellt sind M versus A Plots von einer Mikroarray Hybridisierung. A zeigt die Hybridisierung nicht normalisiert, B die linear normalisierte und C die nicht linear normalisierte Hybridisierung.

Es wurden wie in Material und Methoden beschrieben pro Experiment vier Mikroarrays hybridisiert.

Mithilfe der „Loess smoother“ Normalisierung gefolgt von einer "median absolute deviation" Skala Normalisierung wurden die unterschiedlichen Inkorporationseffizienzen der Cy3- und Cy5- dCTPs normalisiert; genspezifische

Gene	Cy3 = D8 CY5 = WT		Cy3 = WT CY5 = D8	
	Chip1	Chip2	Chip3	Chip4
BAX	3.29	2.81	1.98	2.42
BAX	3.71	2.83	2.67	2.21
BIN1	5.23	7.11	1.08	1.31
BIN1	6.30	9.05	1.39	1.42
FKBP1A	4.56	4.27	0.81	0.91
FKBP1A	4.71	4.75	1.03	0.92
FKBP1A	4.08	6.81	1.24	1.10
FKBP1A	4.85	8.32	1.26	1.07
SREBF2	3.10	5.41	1.93	1.66
SREBF2	4.07	4.22	2.34	1.58
CANX	0.52	0.49	0.55	0.81
CANX	0.48	0.54	0.66	0.98
CDC2	0.57	0.61	0.70	0.60
CDC2	0.49	0.65	0.76	0.66
CITED2	0.60	0.63	0.57	0.70
CITED2	0.81	0.63	0.61	0.76
PBX3	0.66	0.50	0.48	0.89
PBX3	0.59	0.53	0.75	0.86
RASA1	0.66	0.77	0.52	0.62
RASA1	0.75	0.87	0.68	0.62
SKP1A	0.50	0.67	0.78	0.64
SKP1A	0.54	0.62	0.78	0.64
WASF1	0.59	0.48	0.72	0.59
WASF1	0.68	0.70	0.86	0.69
WEE1	0.73	0.62	0.55	0.51
WEE1	0.58	0.85	0.66	0.74

**Tab. 3: Nicht flippende Gene**

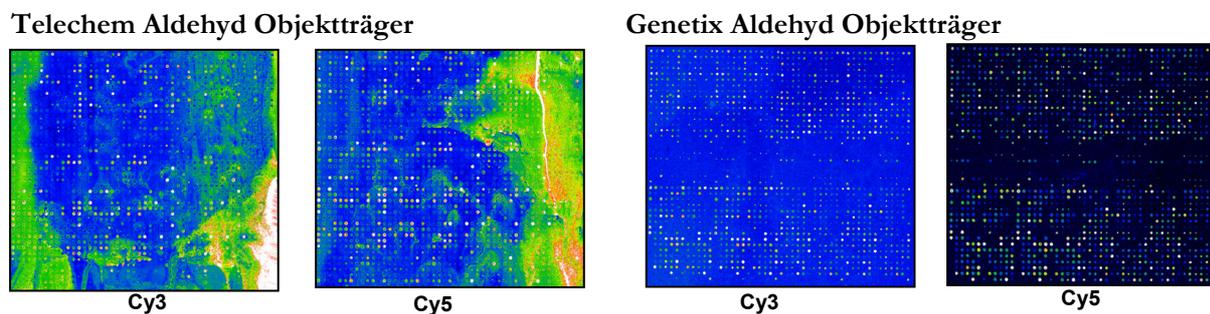
Dargestellt sind genspezifische Effekte aus der Hybridisierung D8-WT. Es sind jeweils beide Replikate dargestellt. Beide Replikate haben bei allen vier Mikroarrays ein ähnliches Verhältnis und nicht wie erwartet bei den Chips 3 und 4 den Kehrwert von Chip 1 und 2. Diese „nicht flippenden Gene“ konnten mit Hilfe des Colorflips detektiert und von der Auswertung ausgeschlossen werden. So wäre z.B für das erste Gen BAX, das bei Chip 1 und 2 (Cy3=D8, Cy5=WT) ein Verhältnis von ca. 3 hat, für die Chips 3 und 4 (Cy3=WT, Cy5=D8) ein Verhältnis von ca. 0,3 zu erwarten gewesen. Die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung, bei der der Kehrwert der Verhältnisse der Chips 3 und 4 verwendet wird, ergeben 1,8 für den Mittelwert und 1,6 für die Standardabweichung. Hohe Standardabweichungen sind häufig ein Indiz für nicht flippende Gene.

Effekte wie z.B. „nicht flippende Gene“ konnten hingegen nicht abgeglichen werden. Um diese zu detektieren und auszuschließen, wurden von den vier Mikroarrays je Experiment zwei im „Color Flip“ hybridisiert. Damit konnten genspezifische Effekte für nachfolgende Auswertungen ausgeschlossen werden. In Tab. 3 sind zwölf Beispiele „nicht flippender Gene“ bei der Hybridisierung der Zelllinie D8 versus WT gezeigt. Im Durchschnitt enthielten alle

in dieser Arbeit durchgeführten Mikroarray Experimente 21 nicht flippende Gene, wobei es sich weitgehend um dieselben Gene handelt.

## 1.7 Zusammenfassung der Mikroarray Etablierung

In den vorangegangenen Kapiteln wurden unterschiedliche beschichtete Mikroarray Oberflächen getestet, wobei die aldehydbeschichteten Objektträger der Firma Telechem am besten abgeschnitten hatten. Aufgrund eines länger anhaltenden Fabrikationsproblems der Firma Telechem (es löste sich die Aldehydbeschichtung von den Objektträgern ab) musste jedoch der Anbieter gewechselt werden (Abb. 36). Es wurden aldehydbeschichtete Objektträger von unterschiedlichen Anbietern getestet und die Objektträger der Firma Genetix wiesen im Bezug auf Signal und Hintergrundeigenschaften die besten Eigenschaften auf und wurden für alle weiteren Hybridisierungen verwendet.



**Abb. 36: Vergleich der Aldehyd beschichteten Objektträger der Firma Telechem und Genetix**

Dargestellt sind hybridisierte Aldehyd beschichtete Objektträger der Firmen Telechem und Genetix. Es ist deutlich erkennbar, dass bei den Objektträgern der Firma Telechem sich die Aldehydoberfläche partiell löst, was zu einem erhöhten Hintergrund führt. Hingegen ist bei den hybridisierten Objektträgern der Firma Genetix nahezu kein Hintergrundrauschen erkennbar.

Bei dem in dieser Arbeit etablierten Mikroarray handelt es sich um einen cDNA Mikroarray. Es wurden insgesamt 1451 IMAGE-Klone für den Mikroarray vom RZPD bestellt und nach anschließender Verifizierung durch Sequenzieren wurden 1259 der IMAGE-Klone zur Sondenherstellung für den Mikroarray verwendet. Die Sonden wurden durch PCR-Reaktionen mit den IMAGE-Klonen hergestellt und anschließend von überschüssigen Nukleotiden, Primern und Salzen gereinigt. Nach dem Testen von fünf unterschiedlichen PCR Aufreinigungen zeigten der „PCR-Purification Kit“ und das „Multiscreen-PCR 96er Filtrationssystem“ die besten Ergebnisse beim anschließenden „Spotten“ bezüglich der Spotmorphologie. Das „Multiscreen-PCR 96er Filtrationssystem“ wurde zur weiteren Aufreinigung der PCR-Produkte verwendet, da es mit dem Pipetierroboter Biomek 2000 automatisiert werden konnte.

Es wurden des Weiteren zwei unterschiedliche Markierungsmethoden (direkte und die indirekte cDNA Markierung) miteinander verglichen. Die indirekte cDNA Markierung zeigte ein schwächeres Spotsignal bei einem gleichzeitig höheren Hintergrund, es wurden stärkere Abweichungen in der Linearität der Regressionsfunktion und in der Varianz gemessen, und differentiell exprimierte Gene waren schwieriger detektierbar. Die direkte cDNA Markierung hingegen zeigte eine geringe Varianz und einheitliche Signalintensitäten der Sonden und wurde für alle Hybridisierungen in dieser Arbeit verwendet.

Durchgeführte Kontrollhybridisierungen zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit der Mikroarray Daten. Der relative Fehler für zwei separate Chips, die mit der gleichen cDNA hybridisiert wurden, war vergleichbar mit dem relativen Fehler von Replikaten auf den Chip. Der relative Fehler bei den „Color Flip“ Experimenten war aufgrund der unterschiedlichen Inkorporationseffizienz am höchsten. Mittels Kontrollgenen konnte gezeigt werden, dass der

Mikroarray einen Sensitivitätsbereich von mindestens 0,01 ng mRNA hat und dass Genexpressionsunterschiede im Bezug die Richtung (Herauf- oder Herabregulation), nicht aber die exakten Genexpressionsverhältnisse detektiert werden können. Um herauszufinden, welcher Normalisierungsalgorithmus für die Mikroarray Experimente am besten geeignet ist, wurden verschiedene nicht lineare Normalisierungsstrategien miteinander verglichen. Die am besten geeignete war die „Loess smoother“ Normalisierung verknüpft mit der "median absolute deviation“ Skala Normalisierung. Einige genspezifische Effekte wie z.B. „nicht flippende Gene“ können durch keine Normalisierungsstrategie ausgeglichen werden, weswegen ein „Color Flip“ bei allen Mikroarrayexperimenten durchgeführt wurde, um diese Sonden zu detektieren und von weiteren Analysen auszuschließen.

## 2 Mikroarray Daten von MDA-MB-435S mit unterschiedlichem E-Cadherinstatus

### 2.1 Herauf- und herabregulierte Gene für jede Zelllinie

Nach der Etablierung und Optimierung der Mikroarrays erfolgte das Auffinden und Charakterisieren von E-Cadherin abhängigen differentiell exprimierten Genen. In Tab. 4 sind für alle acht untersuchten Zelllinien (D8, D370A, E273A, D257A, D9, D479A, MDA und D590A) die 20 am stärksten differentiell herauf- und herabregulierten Gene dargestellt. Auffällig ist, dass viele der differentiell exprimierten Gene bei den vier nicht adhäsiven Zelllinien (D8, D370A, E273A und D257A) identisch sind, bei den anderen vier Zelllinien hingegen nicht. So ist z.B. MMP3 und ITGA3 bei allen nicht adhäsiven Zelllinien heraufreguliert, ansonsten aber nur bei der MDA Zelllinie. In einer Schnittmenge der 100 am stärksten herauf- bzw. herabregulierten Gene aus allen vier nicht adhäsiven Zellen waren die Gene PTN, LAMA4, TRA1, RHEB2, SNAI2, FAM3C, PRKAA1, CREB1, BMI1, SLC26A2 und LRP1 herab- und die Gene LASP1, CDKN1A, BIN1, ITGA3, CYR61 und MMP3 heraufreguliert. Drei dieser Gene waren bei allen acht Zelllinien differentiell exprimiert (LAMA4, PTN, SNAI2). Für die Zelllinien, die Zell-zu-Zell-Adhäsion oder eine Restadhäsion besitzen, wurde ebenfalls eine Schnittmenge der 100 am stärksten herauf-, bzw. herabregulierten Gene bestimmt. Es wurde neben den schon erwähnten Genen LAMA4, PTN und SNAI2 die Gene TSC22, FZD7, E2F5 und PIK3C3 bei den herabregulierten Genen und KPNA2, TYK2, PRLR, PLAT, COL6A1 und SFRP1 bei den heraufregulierten Genen differentiell exprimiert gefunden. Beim direkten Vergleich der Schnittmengengröße aus je zwei Zelllinien stellte sich heraus, dass die Zelllinie D590A und E273A mit 121 übereinstimmenden Genen gefolgt von D257A und E273A mit 117 und D257A und D590A mit 110 übereinstimmenden Genen aus den 100 am stärksten herauf- und 100 stärksten herabregulierten Genen die größten Ähnlichkeiten miteinander haben. Die geringsten Ähnlichkeiten haben D8 und D9 mit 46 übereinstimmenden Genen gefolgt von D370A und D590A sowie MDA und D9 mit jeweils 52 übereinstimmenden Genen. Eine Gesamtliste des Genexpressionsstatus aller Gene ist auf der beigefügten CD unter den Ordner MDA-Zelllinien zu finden.

## 2.2 Biologische Bedeutung der differentiell exprimierten Gene

Auffällig ist der hohe Anteil von Wundheilungsgenen bei den nicht adhäsiven Zellen (einzige Ausnahme ist die Zelllinie D8) im Vergleich zu den adhäsiven Zelllinien. Im Schnitt sind bei den nicht adhäsiven Zellen 33 Prozent Wundheilungsgene (bezogen auf die 20 stärksten herauf- und herabregulierten Gene) im Gegensatz zu 21 Prozent bei den Zellen mit Adhäsion/Restadhäsion gefunden worden. 21 Prozent entspricht dem Anteil der gespotteten Wundheilungsgene auf dem gesamten Mikroarray. In der Tab. 4 sind alle die Gene in grün markiert, die in der Wundheilung eine Rolle spielen. Am Ende von beiden Tabellen ist der Prozentsatz der Wundheilungsgene bei den 40 am stärksten differentiell exprimierten Genen dargestellt.

### A

	D8			D370A			E273A			D257A		
	Gensymbol	Verhältnis	SA	Gensymbol	Verhältnis	SA	Gensymbol	Verhältnis	SA	Gensymbol	Verhältnis	SA
herab-regulierte Gene	SLC26A2	0,14	0,06	LGALS3	0,47	0,18	MSH6	0,52	0,03	PTN	0,34	0,14
	APOD	0,15	0,09	APOD	0,51	0,44	PCNA	0,54	0,12	LAMA4	0,49	0,08
	SNCA	0,20	0,01	PRKCD	0,52	0,12	PTN	0,55	0,13	ARHGGEF6	0,51	0,07
	PTN	0,23	0,11	PRKCM	0,54	0,18	TNFRSF11B	0,56	0,09	SNCA	0,58	0,08
	TNFRSF11B	0,28	0,05	FGF13	0,55	0,18	LAMA4	0,60	0,06	RAC1	0,64	0,17
	IRF4	0,31	0,04	USF2	0,56	0,53	RAC1	0,60	0,08	SNAI2	0,65	0,05
	MXI1	0,34	0,10	PCAF	0,56	0,56	KPNB2	0,62	0,10	PCAF	0,68	0,10
	CYP27A1	0,38	0,09	PMX1	0,56	0,34	ARHGGEF6	0,63	0,09	PCNA	0,71	0,07
	TGFBR3	0,40	0,07	UBE2I	0,56	0,19	PRDX3	0,63	0,07	PRDX3	0,71	0,17
	FOXC1	0,44	0,10	ERBB3	0,56	0,15	RBBP8	0,64	0,03	FZD7	0,73	0,06
	ADA	0,47	0,07	CREB1	0,58	0,31	TRA1	0,64	0,18	MITF	0,74	0,10
	CCNG1	0,50	0,23	NRG2	0,58	0,90	PIK3CA	0,65	0,08	PIK3CA	0,74	0,01
	FAM3C	0,52	0,29	TACSTD1	0,59	0,49	RHEB2	0,68	0,13	RetSAR2	0,74	0,19
	ARHGGEF2	0,53	0,07	ARSA	0,60	0,15	ZNF146	0,68	0,04	MSH5	0,76	0,08
	CBFB	0,53	0,23	LAMA4	0,61	0,07	BUB1B	0,69	0,10	G6PT1	0,76	0,12
	FZD7	0,53	0,09	SNAI2	0,62	0,11	PRKCI	0,69	0,03	WT1	0,76	0,13
	EDNRB	0,55	0,14	PCDH8	0,64	0,28	SNAI2	0,70	0,07	TTPA	0,77	0,08
	CUL1	0,56	0,15	EN1	0,65	0,22	RBPSUH	0,70	0,05	FOXM1	0,78	0,05
	FUS	0,57	0,21	PCDHGA8	0,65	0,17	AMD1	0,71	0,03	CHEK2	0,78	0,08
	SOS1	0,57	0,11	ARHGGEF6	0,65	0,12	CDKN3	0,71	0,10	BIRC5	0,78	0,12
herauf-regulierte Gene	FGF5	1,63	0,26	OSTF1	1,59	0,64	FGF14	1,42	0,16	VEGFC	1,40	0,11
	HMGCS1	1,65	0,44	DUSP5	1,61	0,27	RING	1,43	0,06	UBE2H	1,41	0,49
	K-ALPHA-1	1,68	1,62	UBE1L	1,62	0,31	MMP1	1,45	0,41	CTSB	1,42	0,10
	MADH3	1,69	0,18	COL11A1	1,62	0,31	MFAP2	1,45	0,06	ARHGGEF2	1,43	0,19
	TGFBR2	1,74	1,12	ITGA3	1,63	0,25	PLAUR	1,47	0,15	LASP1	1,43	0,18
	LASP1	1,77	1,30	ESR1	1,64	0,33	COL6A1	1,48	0,34	PRLR	1,43	0,07
	ASPH	1,77	0,72	PLAUR	1,73	0,78	CDKN1A	1,49	0,14	FGF14	1,44	0,18
	PTH	1,78	0,20	FGF14	1,86	1,71	TIMP2	1,49	0,25	CTSH	1,45	0,23
	BUB1	1,89	0,37	CDH5	1,88	0,19	CCND1	1,50	0,17	SFRP1	1,52	0,05
	C1orf29	1,89	0,12	MMP10	1,95	0,97	CD44	1,51	0,16	CLU	1,54	0,32
	INHBA	2,21	0,62	KRT18	1,99	0,67	BIN1	1,55	0,37	DVL1	1,59	0,42
	FKBP1A	2,23	2,16	MMP1	2,08	0,82	CTSB	1,74	0,11	MMP10	1,73	0,37
	WNT7A	2,28	0,54	CLU	2,21	0,41	TIMP1	1,81	0,49	MAPKAPK3	1,88	0,32
	BIN1	2,29	3,16	VEGFC	2,39	0,53	MAPKAPK3	1,85	0,22	CDH3	1,97	0,44
	FHIT	2,56	0,84	CYR61	2,41	1,60	ITGA3	1,96	0,18	ITGA3	2,00	0,15
	FZD2	2,62	0,36	FRZB	2,73	1,11	MMP10	2,04	0,52	KRT18	2,07	0,47
	KAH1	2,71	1,14	SPARC	2,81	0,36	CYR61	2,07	0,28	DUSP5	2,09	0,25
	ITGA3	2,77	1,93	SERPINB2	2,92	1,38	KRT18	2,16	0,20	MMP3	2,27	0,59
	CYR61	3,86	1,67	MMP3	3,20	1,07	SPARC	2,32	0,20	CYR61	2,40	0,47
	HSA11B1	5,69	0,84	CTNNAL1	3,60	0,89	DKK1	2,32	0,27	DKK1	2,58	0,42
MMP3	16,44	2,94	SFRP1	4,26	0,66	MMP3	3,26	0,41	SPARC	3,05	0,25	
Wundheilungsgene	22,50%			32,50%			42,50%			35,00%		

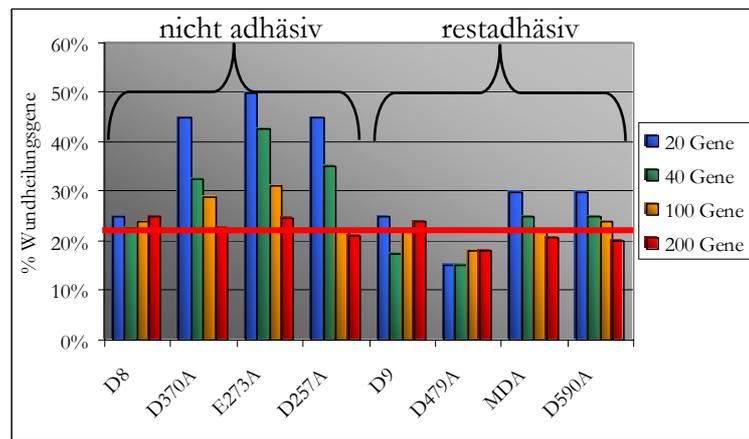
## B

	D9			D479A			MDA			D590A		
	Gensymbol	Verhältnis	SA	Gensymbol	Verhältnis	SA	Gensymbol	Verhältnis	SA	Gensymbol	Verhältnis	SA
herab-regulierte Gene	FIGF	0,60	0,32	LAMA4	0,46	0,05	APOD	0,43	0,24	RBPSUH	0,48	0,06
	CTS2	0,64	0,36	TNFRSF11B	0,50	0,05	LAMA4	0,53	0,14	PTN	0,49	0,10
	LGALS3	0,68	0,12	CD63	0,60	0,21	CYP27A1	0,55	0,16	LAMA4	0,56	0,04
	FKBP1A	0,68	0,34	RPN2	0,65	0,04	IRF4	0,56	0,12	TNFRSF11B	0,57	0,06
	TANK	0,69	0,32	TSC22	0,65	0,06	TGFBR3	0,56	0,13	TSC22	0,58	0,05
	FOXF1	0,70	0,45	FDFT1	0,66	0,11	SNAI2	0,58	0,17	PRKCI	0,61	0,15
	TSC22	0,70	0,15	ITGB5	0,67	0,03	PTN	0,59	0,08	UBE2D1	0,62	0,13
	BAP1	0,71	0,36	MXI1	0,68	0,05	MXI1	0,61	0,11	PCNA	0,64	0,05
	APOD	0,71	0,19	FZD7	0,68	0,05	CITED1	0,61	0,30	AMD1	0,65	0,07
	TIMP2	0,72	0,57	PIK3CA	0,70	0,10	FUS	0,65	0,12	BMI1	0,65	0,14
	ARHGGEF6	0,73	0,30	AP2M1	0,72	0,14	SNCA	0,66	0,13	PIK3CA	0,65	0,04
	PRKCD	0,73	0,32	LGALS3	0,72	0,14	CDH15	0,67	0,25	BLM	0,67	0,07
	PFDN5	0,74	0,37	IGFBP4	0,72	0,07	LGALS3	0,70	0,08	PRDX3	0,67	0,22
	LAMA4	0,76	0,31	EMS1	0,72	0,27	BAX	0,73	0,27	HPRT1	0,68	0,18
	PHYH	0,76	0,26	PLTP	0,74	0,11	FZD7	0,74	0,10	MSH6	0,69	0,14
	PLAT	0,76	0,17	PLA2G2A	0,74	0,16	RPS9	0,75	0,40	ZNF146	0,70	0,11
	PRKCC	0,76	0,25	MBTPS1	0,74	0,09	ILK	0,75	0,19	ARHGGEF6	0,70	0,07
	TFAP2C	0,76	0,27	ARHGGEF6	0,74	0,03	FBN1	0,75	0,13	ITGAE	0,70	0,19
	AP2M1	0,76	0,29	SCARB1	0,75	0,04	ERCC2	0,75	0,27	RBBP8	0,71	0,19
	RAD51	0,77	0,27	TFAP2C	0,75	0,22	BTK	0,77	0,09	TRA1	0,71	0,04
herauf-regulierte Gene	MAPK8	1,28	0,28	DVL1	1,25	0,26	BUB1	1,29	0,32	CTSH	1,32	0,15
	USF1	1,28	0,90	MAPK11	1,25	0,36	PPP2CA	1,30	0,75	PPP2R4	1,33	0,20
	ADSL	1,28	0,12	CTNNA1	1,25	0,18	CCNA2	1,33	0,08	PAX9	1,34	0,32
	JUN	1,29	0,20	SERPINE1	1,27	0,37	OSTF1	1,33	0,27	SNAI2	1,36	0,04
	KRT8	1,29	0,55	LASP1	1,29	0,35	CAV1	1,33	0,26	FZD6	1,37	0,10
	HLA-DRA	1,29	0,53	CCNB1	1,29	0,16	FZD8	1,33	0,44	PLAT	1,39	0,11
	TIAM1	1,29	0,33	CDKN1A	1,30	0,14	FZD9	1,34	0,20	ARHGGEF2	1,39	0,09
	RFNG	1,30	1,11	COL3A1	1,31	0,31	FAM3C	1,39	0,42	SREBF2	1,40	1,22
	CTNNA1	1,30	0,50	HLA-DRA	1,31	0,15	LASP1	1,42	0,61	FDPS	1,41	0,43
	MAPT	1,30	0,53	FZD6	1,31	0,12	ITGA3	1,44	0,15	MYC	1,45	0,35
	MSH3	1,31	0,23	RPS26	1,32	0,31	RAD23B	1,45	0,28	FDFT1	1,46	0,12
	POU2AF1	1,33	0,53	ADSL	1,33	0,12	DHCR7	1,48	0,27	HLA-DRA	1,47	0,15
	TYK2	1,34	0,57	NF2	1,39	0,18	HSA11B1	1,49	0,53	COL6A1	1,49	0,12
	KPNB1	1,34	0,38	FRZB	1,52	0,26	MMP12	1,56	0,31	FRZB	1,55	0,36
	COL6A2	1,37	0,32	SPARC	1,56	0,14	PRKAA1	1,58	0,23	SPP1	1,64	0,18
	RBL2	1,40	0,32	CDC20	1,58	0,81	AKR1C3	1,63	0,40	CDC20	1,69	1,12
	CDH17	1,41	0,23	CAV1	1,58	0,08	SFRP1	1,77	0,32	CTSB	1,83	0,09
	PIK3CA	1,43	0,44	SFRP1	2,07	0,22	FRZB	2,01	1,04	CYR61	2,05	0,57
	DIA1	1,44	0,24	CTNNA1	2,21	0,43	SPARC	2,07	0,49	DKK1	2,07	0,55
	MYC	1,45	0,37	CYR61	3,56	0,71	MMP1	6,27	3,15	SPARC	2,31	0,27
EYA3	1,46	0,36	DKK1	4,15	0,51	MMP3	8,22	4,55	SFRP1	3,15	0,51	
Wundheilungsgene	18,00%			15,00%			25,00%			25,00%		

**Tab. 4 A und B: Differentiell exprimierte Gene der acht unterschiedlichen MDA-MB-435Zelllinien**

Die Tab. A zeigt die 20 am stärksten herauf- und herabregulierten Gene bei den Zelllinien, die ihre adhäsiven Eigenschaften weitgehend verloren haben (D8, D370A, E273A und D257A) und die Tab. B die 20 am stärksten herauf- und herabregulierten Gene bei den Zelllinien, die noch eine Restadhäsion haben (D9, D479A MDA und D590A). Es ist sowohl der Mittelwert der Genexpressionsverhältnisse der jeweiligen Zelle zu den WT Zellen als auch die Standardabweichung aus vier hybridisierten Mikroarrays angegeben. In grün sind die Gene markiert, die in der Wundheilung involviert sind. Am Ende von beiden Tabellen ist der Prozentsatz der Wundheilungsgene bei den 40 am stärksten differentiell exprimierten Genen dargestellt.

Der Anteil der Wundheilungsgene ist bei den am stärksten differentiell exprimierten Genen der nicht adhäsiven Zellen am höchsten und nimmt bei den weniger differentiell exprimierten Genen sukzessiv ab. So beträgt der Anteil der Wundheilungsgene bei der Zelllinie D370A bei den 20 am stärksten differentiell exprimierten Genen 45%, bei den 40 am stärksten differentiell exprimierten Genen 33%, bei den 100 am stärksten differentiell exprimierten Genen 29% und bei den 200 am stärksten differentiell exprimierten Genen 23%. Alle diese Werte liegen signifikant über der Gesamtzahl der 21% insgesamt gespotteten Wundheilungsgene ( $p$ -Wert unter 0,05). Ähnliche Werte sind auch bei den nicht adhäsiven Zelllinien E273A und D257A vorhanden. In der Tab. 4 ist der Anteil der Wundheilungsgene für alle acht Zelllinien für die 20, 40, 100 und 200 stärksten differentiell exprimierten Gene dargestellt.

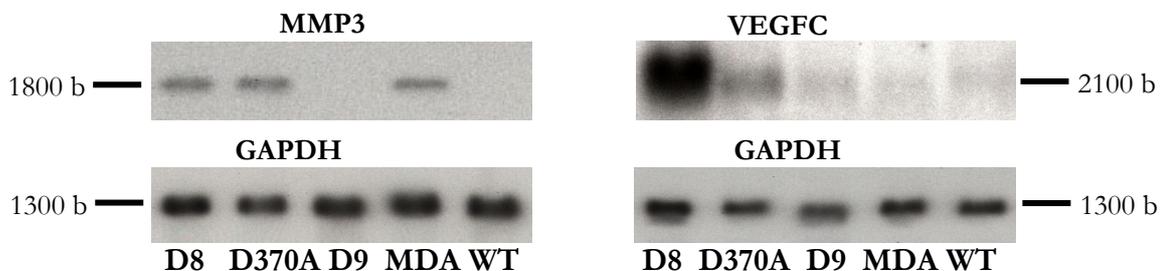


**Abb. 37: Anteil der Wundheilungsgene bei den differenziell exprimierten Genen**

Gezeigt ist der Anteil der Wundheilungsgene bei den 20, 40, 100 und 200 am stärksten differenziell exprimierten Genen (jeweils 50% herab- und 50% heraufregulierte Gene). Die rote Linie markiert die 21% aller auf den Mikroarray gespotteten Wundheilungsgene.

## 2.2 Validierung der Mikroarray Daten mittels Northern Blot Analysen

Mittels Northern Blot Analysen wurden die mit den Mikroarrays gefundenen Genexpressionsunterschiede für 30 ausgesuchte Gene validiert (für die Zelllinien D8, D370A, D9, MDA und WT). Für jedes Gen wurden jeweils mindestens drei Northern Blot Analysen durchgeführt. In der Abb. 38 sind exemplarisch zwei Northern Analysen für MMP3 und VEGFC dargestellt. Im Gegensatz zu den WT und D9 Zelllinien, bei denen mittels Northern Analyse keine MMP3 Expression detektierbar war, war eine Expression von MMP3 bei den Zelllinien D8, D370A und MDA nachweisbar. Bei VEGFC konnte im Vergleich zu der WT Zelllinie eine Überexpression des Gens in den Zelllinien D8 und D370A nachgewiesen werden, nicht aber bei den D9 oder der MDA Zelllinie. Alle Northern Blot Daten wurden mit GAPD normalisiert.



**Abb. 38: Northern Blot Analysen von MMP3 und VEGFC**

Dargestellt sind exemplarisch zwei Northern Blot Analysen für MMP3 und VEGFC und der Abgleich mit GAPD. Die Größe der Banden sind links oder rechts von den Northern Blots angezeigt.

In der Tab. 5 sind sowohl die Mittelwerte der Expressionsverhältnisse der Northern Blot Analysen als auch der Mikroarray Experimente für 30 Gene gezeigt. Die Genexpressionsunterschiede, die in Bezug auf die Richtung der Expression (heraufreguliert, herabreguliert oder unverändert) bei beiden Methoden übereinstimmen, sind in grün markiert. Es konnten 88 Prozent der Genexpressionsunterschiede, die mittels Mikroarrays gefunden wurden, durch Northern Blot Analysen validiert werden, zwölf Prozent hingegen zeigten widersprüchliche Ergebnisse (diese Felder sind rot markiert). Die Pearsonkorrelation betrug 0,83 bei einem p-Wert von unter 0,05.

Nr.	Gensymbol	D8 (Microarray)	D8 (Northern)	D370A (Microarray)	D370A (Northern)	D9 (Microarray)	D9 (Northern)	MDA (Microarray)	MDA (Northern)
1	ACTB	1,24	1,67	1,11	2,44	1,03	1,33	1,01	1,16
2	APOD	0,15	0,00	0,51	0,68	0,71	0,46	0,43	0,00
3	CDH5	0,97	0,76	1,88	1,02	1,07	1,09	1,04	1,06
4	CDKN1B	0,66	0,23	0,92	0,40	1,00	0,59	0,84	0,75
5	CDKN2A	1,35	2,24	0,97	1,42	1,02	0,86	0,90	0,65
6	CTNNAL1	1,02	6,33	3,60	6,69	1,30	3,91	1,05	6,33
7	CTSH	1,13	2,00	1,34	2,45	1,06	1,17	1,04	2,71
8	CYR61	3,86	3,72	2,41	1,42	0,81	0,38	0,95	0,84
9	FAM3C	0,52	0,66	1,53	1,40	0,97	0,36	1,39	1,02
10	FGF1	1,12	1,21	1,34	1,21	0,92	1,07	0,95	0,98
11	FGF13	0,72	0,37	0,55	0,04	1,07	0,69	0,83	0,24
12	FRZB	1,41	2,44	2,73	7,23	1,03	1,83	2,01	5,09
13	FUS	0,57	0,59	0,68	0,61	0,89	0,53	0,65	0,31
14	ITGA3	2,77	6,07	1,63	2,78	0,91	0,69	1,44	1,87
15	KPNA2	1,09	3,31	1,46	2,52	0,88	0,85	1,22	1,94
16	KRT18	1,03	3,75	1,99	2,22	0,90	0,44	1,12	2,71
17	MIF	1,35	1,52	0,96	1,60	0,98	1,00	0,85	1,13
18	MMP1	1,08	2,01	2,08	2,21	0,98	8,55	6,27	11,54
19	MMP3	16,44	148,08	3,20	100,00	0,99	0,00	8,22	113,69
20	NME1	1,11	2,91	1,43	1,53	1,12	1,15	0,96	0,49
21	PMX1	0,80	0,02	0,56	0,86	0,89	0,33	1,01	0,30
22	PRKCD	0,94	0,58	0,52	0,66	0,73	0,57	1,00	0,35
23	RAD23B	1,16	2,14	1,36	3,27	1,09	1,39	1,45	1,58
24	SFRP1	1,31	3,37	4,26	7,50	1,27	1,61	1,77	5,68
25	SPARC	1,16	1,33	2,81	2,25	1,11	0,90	2,07	2,62
26	TIMP1	0,99	3,60	1,34	3,43	0,87	1,26	0,98	1,91
27	TIMP2	0,99	0,60	0,97	0,75	0,72	0,33	0,90	0,47
28	TRA1	1,19	1,37	1,30	1,73	0,95	0,74	1,03	0,70
29	VEGFC	nd	5,24	2,39	2,77	0,98	0,88	nd	1,09
30	ZNF9	0,97	0,94	0,87	1,16	1,04	1,06	0,98	1,00

**Tab. 5: Validierung durch Northern Blot Analysen**

Die Tab. zeigt die Genexpressionsunterschiede jedes Gens der jeweiligen Zelllinie im Vergleich zur WT Zelllinie. Es sind die Mittelwerte der Verhältnisse der Mikroarray Experimente zu den Mittelwerten der Verhältnisse der Northern Blot Analysen im direkten Vergleich zueinander abgebildet. Grün sind die Verhältnisse, die sich durch Northern Blot Analysen validieren ließen, in rot sind die Verhältnisse, die sich im Bezug auf die Richtung der Genexpressionsunterschiede nicht validieren ließen und in weiß die nicht detektierbaren Genexpressionen (nd) dargestellt.

### 2.3 Validierung der Mikroarray Daten mittels quantitativer realtime RT PCR

Zusätzlich zu der Validierung mittels Northern Blot Analysen wurden 18 ausgesuchte Gene durch quantitative realtime RT PCR validiert, davon sechs Gene, die bereits mittels Northern Blot Analyse validiert wurden. Im Gegensatz zur Validierung mittels Northern Blot Analyse wurden hierbei nicht nur die Verhältnisse der Zelllinien D8, D370A, D9, MDA und WT sondern auch die Verhältnisse der Zelllinien D257A, E273A, D579A und D590A bestimmt. In der Tab. 6 sind die Mittelwerte der Genexpressionsunterschiede der Mikroarray Versuche und die der quantitativen realtime RT PCRs für alle acht Zelllinien angegeben. In grün sind wiederum die Verhältnisse markiert, bei denen es im Bezug auf die Richtung der Genexpression eine Übereinstimmung gab und rot sind die Verhältnisse mit Diskrepanzen markiert. Es konnten hierbei 94 Prozent der Verhältnisse der Mikroarray Daten mittels quantitativer realtime RT PCR validiert werden, sechs Prozent zeigten widersprüchlich Ergebnisse. Diese Methode ist deutlich sensitiver als die Northern Blot Analyse. Die erhöhte Sensitivität im Vergleich zu den Northern Blot Analysen ist z.B. anhand der Genexpression von MMP3 erkennbar. Während mittels Northern Blot Analyse für die Zelllinien D9 und WT keine MMP3 Expression nachgewiesen werden konnte (Tab. 5), war mittels quantitativer realtime RT PCR noch eine schwache Genexpression bei diesen Zelllinien detektierbar (Tab. 6).

Nr.	Genesymbol	D8 Micro-array	D8 Taq-man	D370A Micro-array	D370A Taq-man	D9 Micro-array	D9 Taq-man	MDA Micro-array	MDA Taq-man	D257A Micro-array	D257A Taq-man	E273A Micro-array	E273A Taq-man	D479A Micro-array	D479A Taq-man	D590A Micro-array	D590A Taq-man
1	ARHGEF6	1,01	0,01	0,65	0,39	0,73	0,31	1,01	0,09	0,51	0,13	0,63	0,11	0,74	0,34	0,70	0,19
2	Asin2	0,99	0,75	0,97	1,53	0,98	1,50	1,04	1,91	1,02	0,65	1,11	1,30	1,09	1,16	1,18	1,01
3	CCND1	1,32	1,47	1,23	1,07	1,09	1,15	1,03	1,58	1,16	1,19	1,50	1,08	1,02	1,45	1,05	0,62
4	CYR61	3,86	5,71	2,41	2,97	0,81	0,79	0,95	0,72	2,40	10,50	2,07	5,79	3,56	17,57	2,05	7,10
5	FZD7	0,53	0,12	0,86	0,78	0,83	0,40	0,74	0,31	0,73	0,21	0,82	0,17	0,68	0,28	0,75	0,16
6	ITGA3	2,77	4,86	1,63	2,54	0,91	0,60	1,44	1,92	2,00	1,98	1,96	1,26	0,82	0,87	0,76	0,44
7	LAMA4	0,70	0,13	0,61	0,70	0,76	0,47	0,53	0,22	0,49	0,53	0,60	0,38	0,46	0,43	0,56	0,45
8	MMP1	1,08	0,61	2,08	5,75	0,98	0,32	6,27	36,49	1,09	1,41	1,45	8,12	0,90	0,03	0,99	0,01
9	MMP3	16,44	48,05	3,20	56,28	0,99	0,48	8,22	75,61	2,27	169,39	3,26	116,85	1,06	3,89	1,02	1,06
10	MMP8	nd	0,00	nd	2,23	nd	2,47	nd	1,23	1,11	0,51	1,59	0,19	1,01	2,10	1,02	1,21
11	MXI1	0,34	0,12	0,99	0,60	0,90	0,44	0,61	0,24	0,80	0,64	0,82	0,35	0,68	0,50	0,84	0,60
12	MYC	1,40	1,85	0,71	0,77	1,45	1,35	0,83	0,62	0,75	0,88	1,02	1,18	1,08	0,92	1,22	1,45
13	PTN	0,23	0,00	0,75	0,44	0,87	0,23	0,59	0,20	0,34	0,02	0,55	0,04	0,82	0,55	0,49	0,06
14	SNAI2	0,58	0,13	0,62	0,43	0,88	0,54	0,58	0,17	0,65	0,33	0,70	0,20	0,84	0,82	1,36	2,07
15	SPARC	1,16	1,45	2,81	2,93	1,11	0,93	2,07	2,65	3,05	1,82	2,32	1,27	1,56	1,55	2,31	1,28
16	TGFBR3	0,40	0,05	0,98	0,86	1,07	0,56	0,56	0,13	0,79	0,17	0,81	0,17	0,77	0,14	0,96	0,12
17	TIMP3	nd	0,13	nd	1,15	nd	0,48	nd	1,42	0,46	0,45	0,44	0,22	0,44	0,51	0,39	0,25
18	VEGFC	nd	10,07	2,39	2,55	0,98	0,57	nd	1,17	1,40	4,10	1,25	2,67	1,16	2,20	0,92	0,59

Tab. 6: Validierung mittels quantitativer realtime RT PCR

Die Tab. zeigt die Verhältnisse der Expression der jeweils angegebenen Zelle zur WT Zellen. Es sind die Mittelwerte der Genexpressionsunterschiede der Mikroarray Experimente und die Mittelwerte der Genexpressionsunterschiede der quantitativen realtime RT PCR (TaqMan) im direkten Vergleich zueinander abgebildet. In grün sind die Genexpressionsunterschiede markiert, die sich durch quantitative realtime RT PCR in Bezug auf die Richtung validieren ließen, in rot sind die Genexpressionsunterschiede markiert, die sich nicht validieren ließen und in weiß nicht determinierbare Genexpressionen (nd) dargestellt.

## 2.4 Vergleich der Northern Blot Analysen mit quantitativen realtime RT PCRs

In den Kapiteln 2.1 und 2.2 wurde gezeigt, inwieweit sich die Mikroarray Daten mittels Northern Blot Analyse und quantitativer realtime RT PCR validieren ließen. In diesem Kapitel werden die beiden Validierungsmethoden untereinander verglichen. Es wurden von sechs Genen die Genexpressionsunterschiede mit beiden Methoden für die Zelllinien D8, D370A, D9 und MDA bestimmt. Die Validierungsergebnisse für die Gene CYR61, ITGA3, MMP3, SPARC und VEGFC stimmten bei beiden Methoden überein. Hingegen gab es bei dem Gen MMP1 eine Diskrepanz bei der Zelllinie D8 und bei D9. Die Validierungen beider Methoden werden in der Tab. 7 direkt miteinander verglichen. Die Pearsonkorrelation betrug 0,90 bei einem p-Wert von unter 0,05. Insgesamt konnten 94% aller Mikroarray Ergebnisse mittels quantitative realtime RT PCR validiert werden, aber nur 88% mittels Northern Blot Analyse. Des Weiteren konnte mittels quantitativer realtime RT PCR auch schwächere Genexpressionen wie z.B. die von MMP3 bei den Zelllinien D9 und WT detektiert werden, nicht hingegen aber mittels Northern Blot Analyse. Dies zeigt, dass die quantitative realtime RT PCR die bessere, weil sensitivere Validierungsmethode ist.

Nr.	Gensymbol	D8			D370A			D9			MDA		
		Northern	Taqman	Microarray									
1	CYR61	3,72	5,71	3,86	1,42	2,97	2,41	0,38	0,79	0,81	0,84	0,72	0,95
2	ITGA3	6,07	4,86	2,77	2,78	2,54	1,63	0,69	0,60	0,91	1,87	1,92	1,44
3	MMP1	2,01	0,61	1,08	2,21	5,75	2,08	8,55	0,32	0,98	11,54	36,49	6,27
4	MMP3	148,08	48,05	16,44	100,00	56,28	3,20	0,00	0,48	0,99	113,69	75,61	8,22
5	SPARC	1,33	1,45	1,16	2,25	2,93	2,81	0,90	0,93	1,11	2,62	2,65	2,07
6	VEGFC	5,24	10,07	nd	2,77	2,55	2,39	0,88	0,57	0,98	1,09	1,17	nd

Tab. 7: Northern Blot Analyse versus quantitative realtime RT PCR

In der Tab. werden die Validierungsmethoden quantitative realtime RT PCR und Northern Blot Analyse miteinander verglichen. Es sind jeweils die Mittelwerte der Verhältnisse abgebildet. In grün sind die Verhältnisse markiert, bei denen die quantitative realtime RT PCR dieselben Daten in Bezug auf die Richtung der Genexpression (herauf- oder herabregulierte, bzw. keine differentielle Expression) wie die Northern Blot Analysen lieferten und in rot die widersprüchlichen Ergebnisse bei dem Gen MMP1.

## 2.5 Clusteranalysen

Wie an den vorangegangenen Kapiteln gezeigt ist, generieren Mikroarrayexperimente große Datenmengen. Es ist schwierig bis unmöglich für Menschen ein derartig großes Datenset zu verarbeiten. Aus diesem Grund ist eine Visualisierung aller Informationen mittels Clusteranalyse eine gute Möglichkeit diese Daten verständlicher darzustellen. Das Grundkonzept in Clusteranalysen ist, ähnlich exprimierte Gene zu identifizieren, zu gruppieren und anschließend mit der Biologie (in diesem Fall sind es die unterschiedlichen Zelllinien) zu korrelieren. Cluster Analysen organisieren die Daten in einer kleinen Anzahl von (relativ) homogenen Gruppen. Es werden die Veränderungen im Genexpressionsmuster und nicht die tatsächliche Genexpressionsveränderung geclustert. Es können sich somit sowohl herauf- als auch herabregulierte Gene in denselben Cluster befinden. Anhand der Abb. 39A ist erkennbar, dass sich die Zelllinien E273A und D257A (beide nicht adhäsiv) im Bezug auf das Genprofils sehr ähnlich sind. Aber auch die Zelllinien D9, D590A und D479A (restadhäsiv) sind sich bezüglich des Expressionsprofils sehr ähnlich. D8 und D370A (nicht adhäsiv) haben hingegen weniger große Ähnlichkeit als die beiden zuvor genannten Zellcluster. Die nicht transfizierte Zelllinie MDA (restadhäsiv) hat die größte Ähnlichkeit mit den Zelllinien E273A und D257A (nicht adhäsiv). Somit spiegeln sich interessanterweise die Motilitäts- und Adhäsionseigenschaften der Zelllinien im Genexpressionsprofil wieder.

In der Abb. 39B wird das Clustern über die 179 sich auf dem Mikroarray befindlichen Wundheilungsgene gezeigt. Die Zellgruppierung im „Wundheilungcluster“ ähnelt dem Cluster über alle Gene. Somit sind die Genexpressionswerte der Wundheilungsgene maßgeblich an dem Gesamtcluster beteiligt. Die Zelllinien E273A und D257A (beide nicht adhäsiv) sind wiederum im Bezug auf das Genexpressionsprofils der Wundheilungsgene eng miteinander verwandt. Auch die Zelllinien D9, D590A und D479A (restadhäsiv) sind sich bezüglich des Expressionsprofils wieder sehr ähnlich. Die Zelllinie D8 steht bei dem Wundheilungcluster ebenfalls wieder separat. Das Genexpressionsprofil der MDA Zelllinie hat eine geringe Ähnlichkeit mit den Genexpressionsprofilen der Zelllinien E273A und D257A und dem Genexpressionsprofilen der Zelllinien D9, D590A und D479A.

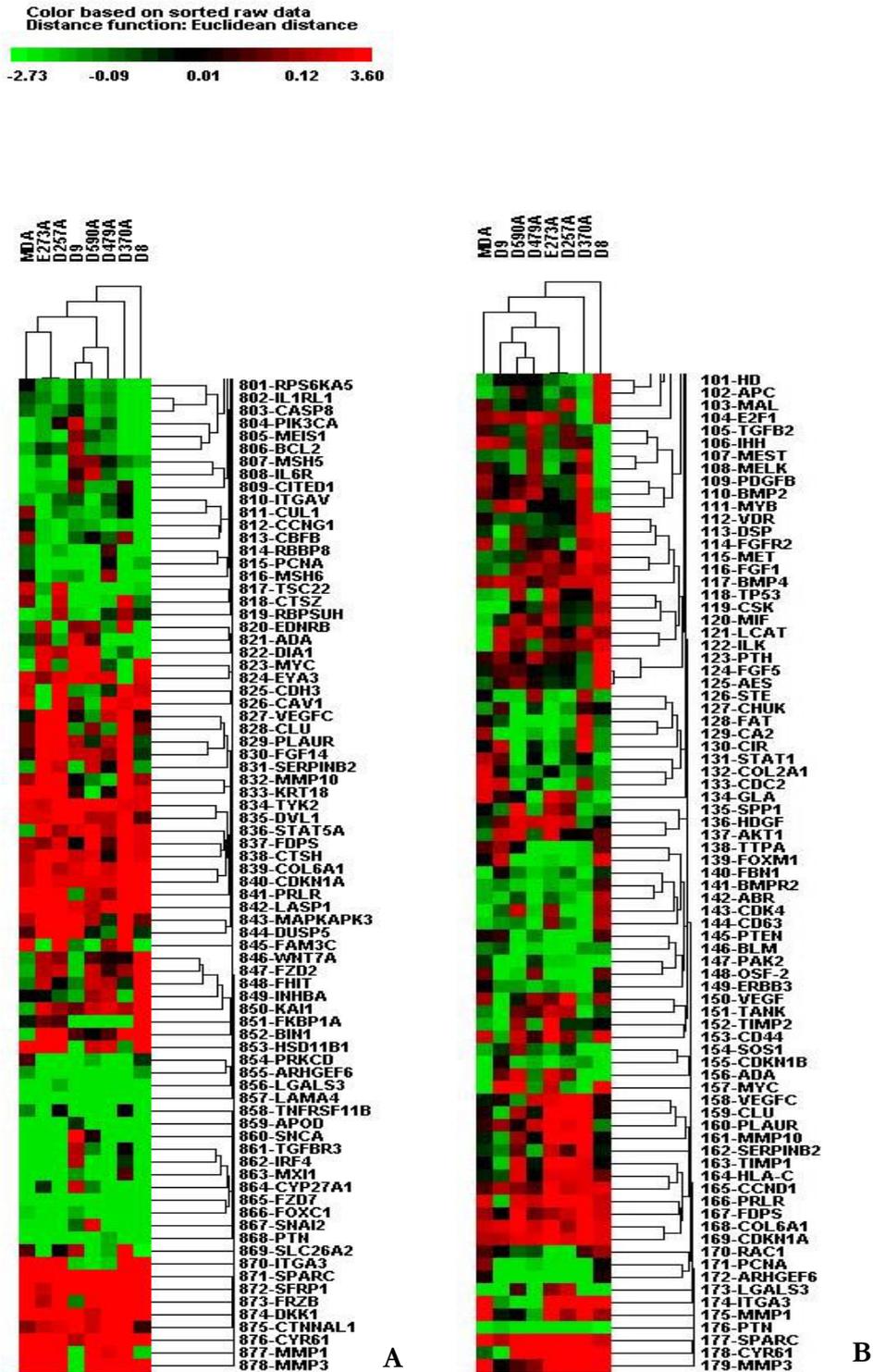


Abb. 39: Cluster

Dargestellt ist in der Abb. A das Clustering über alle auf dem Mikroarray gespotteten Gene (insgesamt 878 Gene) und in B das Clustering nur über die Wundheilungsgene (insgesamt 179 Gene und eine Teilmenge aus den 878 Genen). Es werden Gene und Zelllinien im Bezug auf Gemeinsamkeiten miteinander verglichen. Auf der einen Achse sind die Zelllinien und auf der anderen Achse die Gene dargestellt. Der Abstand in den „Stammbäume“ zeigt den Grad der Gemeinsamkeit an. Die Gemeinsamkeit wird als Euklidische Distanz zwischen den Expressionsvektoren gemessen. Alle heraufregulierten Gene sind in rot, alle herabregulierten Gene in grün markiert. In beiden Clusteranalysen gruppieren sich dieselben Zelllinien zusammen (z.B. E273A und D257A). Die Gengruppen, die miteinander clustern, sind sich ebenfalls bei beiden Clustern sehr ähnlich (z.B. VEGFC und CLU).

### 3 Einfluss des Zellkontakts auf den WNT-Signalweg

#### 3.1 Einfluss von E-Cadherin auf den WNT-Signalweg

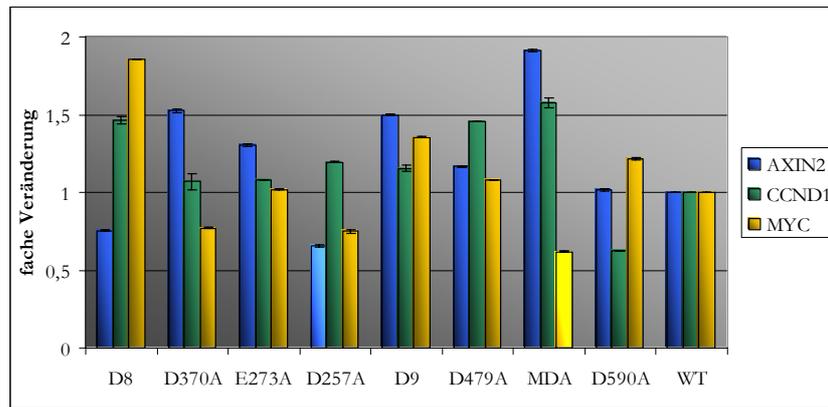
Die Frage, inwieweit E-Cadherin Einfluss auf den WNT-Signalweg hat, wurde in dieser Arbeit in erster Linie durch die Analyse von Genexpressionen mit Hilfe der Mikroarray Technik untersucht. Der WNT-Signalweg endet im Zellkern, in dem  $\beta$ -Catenin zusammen mit Tcf/Lef die Transkription von Zielgenen wie CCND1 (Cyclin D1), MYC, JUN und weiteren Genen moduliert (Schwartz *et al.*, 2003; Zhai *et al.*, 2002). Auf dem Mikroarray befinden sich 13 Gene, die von  $\beta$ -Catenin/Tcf/Lef transkribiert werden. Um aussagen zu können, ob E-Cadherin über den WNT-Signalweg einen Einfluss auf die  $\beta$ -Catenin/Tcf/Lef abhängige Transkription hat, wurden die Verhältnisse und Standardabweichungen der Expression für diese 13 Gene ermittelt (Tab. 8). Auffällig ist, dass eine differentielle Expression ( $<0,7$  und  $>1,4$ ) von  $\beta$ -Catenin/Tcf/Lef transkribierten Genen in erster Linie bei der Zelllinie D8 vorkommt. Eine Ausnahme bildet das Gen FZD7, welches bei allen Zellen leicht und bei der Zelllinie D479A differentiiell herabreguliert ist, CD44 bei der Zelllinie E273A und PLAUR, das bei der Zelllinie E273A und D370A differentiiell heraufreguliert ist. Die differentielle Expression von CCND1 bei der Zelllinie E273A und von MYC bei D590A konnte hingegen nicht durch quantitative realtime RT PCR bestätigt werden (Tab. 6).

Nr.	Gen-symbol	D8		D370A		D9		MDA		D257A		E273A		D479A		D590A	
		Verhältnis	SD														
1	AXIN2	0,99	0,08	0,97	0,79	0,98	0,34	1,04	0,11	1,02	0,12	1,11	0,03	1,09	0,10	1,18	0,14
2	BMP4	1,42	0,46	1,15	0,47	1,16	0,71	1,07	0,19	1,14	0,13	1,06	0,05	1,01	0,08	1,11	0,16
3	CCND1	1,08	0,15	1,13	0,54	1,14	0,34	1,01	0,10	1,16	0,10	1,50	0,17	1,02	0,06	1,05	0,05
4	CD44	1,53	0,66	1,02	0,30	0,91	0,19	1,32	0,69	1,06	0,09	1,51	0,16	1,02	0,13	1,15	0,11
5	FZD7	0,66	0,39	0,90	0,30	0,86	0,34	0,79	0,28	0,73	0,06	0,82	0,07	0,68	0,05	0,75	0,07
6	JUN	0,97	0,13	1,07	0,37	1,09	0,23	0,99	0,08	1,01	0,02	0,94	0,02	1,02	0,09	0,91	0,06
7	LEF1	1,06	0,22	1,00	0,18	1,04	0,83	1,05	0,16	1,04	0,13	0,97	0,04	1,04	0,05	1,13	0,04
8	MMP7	1,01	0,17	0,95	0,70	0,91	0,33	1,06	0,26	0,97	0,03	0,98	0,06	0,95	0,07	0,95	0,03
9	MYC	1,40	0,26	0,88	0,43	1,21	0,48	0,95	0,13	0,88	0,07	1,18	0,07	0,92	0,10	1,45	0,35
10	PLAUR	0,93	0,34	1,73	0,84	1,07	0,43	1,01	0,08	1,31	0,13	1,47	0,15	1,14	0,15	1,01	0,04
11	PPARD	1,03	0,11	0,89	0,25	1,06	0,42	0,96	0,15	1,06	0,05	1,10	0,06	1,01	0,06	1,06	0,20
12	TCF1	1,02	0,12	1,00	0,28	0,96	0,37	0,98	0,29	1,08	0,12	1,06	0,16	0,91	0,05	0,99	0,05
13	VEGF	1,09	0,39	0,91	0,59	0,83	0,49	1,07	0,27	1,40	0,13	1,05	0,09	1,09	0,15	0,98	0,10

Tab. 8: E-Cadherin abhängige Genexpressionsveränderungen der  $\beta$ -Catenin/Tcf/Lef transkribierten Gene

In der Tab. sind die Genexpressionsverhältnisse und die Standardabweichungen aus den Mikroarray Analysen von 13 Genen, die durch  $\beta$ -Catenin/Tcf/Lef transkribiert werden, für alle 8 Zelllinien im Vergleich zur WT Zelllinie gezeigt. In grün sind die Verhältnisse markiert, bei denen keine differentielle Expression nachweisbar ist (Verhältnisse zwischen 0,7 und 1,4) und in rot sind die differentiiell exprimierten Gene markiert.

Drei der  $\beta$ -Catenin/Tcf/Lef transkribierten Gene (AXIN2, CCND1 und MYC) wurden exemplarisch mittels quantitativer realtime RT PCR validiert. Wie aus der Abb. 40 ersichtlich ist, zeigte keine der acht Zelllinien bei einem der drei Gene eine differentielle Expression. Die differentielle Expression von CCND1 bei der Zelllinie E273A und von MYC bei D590A, die bei den Mikroarrays festgestellt wurden, konnte nicht bestätigt werden. Alle Genexpressionsunterschiede lagen bei der quantitativen realtime RT PCR zwischen 0,5 und 2,0 (ein Gen wurde als differentiiell betrachtet, wenn das Genexpressionsverhältnis kleiner als 0,7 oder größer als 1,4 für die Mikroarray Analysen und kleiner als 0,5 oder größer als 2 für die quantitativen realtime RT PCRs war).



**Abb. 40: Validierung der  $\beta$ -Catenin/Tcf/Lef transkribierten Gene AXIN2, CCND1 und MYC**

Drei der in der Tab. 8 beschriebenen Gene wurden mittels quantitativer realtime RT PCR für alle acht Zelllinien validiert. Es handelt sich um die Gene AXIN2, CCND1 und MYC. Bei keinem der Gene war eine differentielle Expression nachweisbar (Verhältnis unter 0,5 oder über 2).

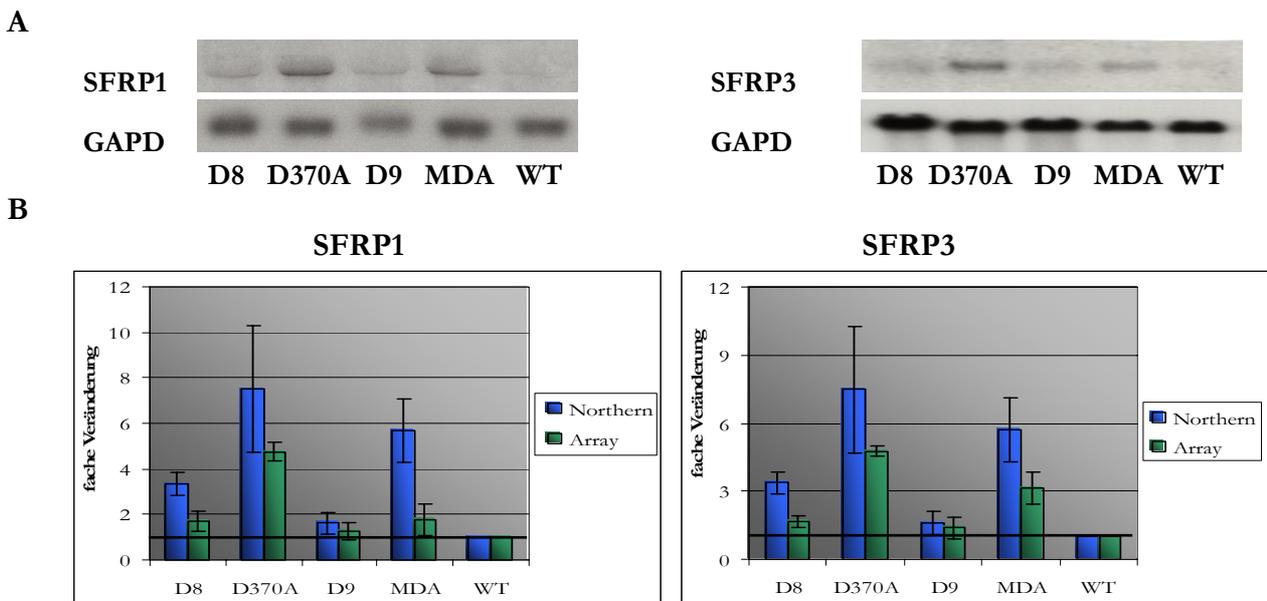
Auf dem Mikroarray befinden sich neben den Zielgenen des WNT Signalwegs noch 58 weitere Gene, die direkt am WNT Signalweg beteiligt oder direkt mit ihm vernetzt sind. Eine Liste der Expressionsunterschiede ist für alle acht Zelllinien in Tab. 9 aufgelistet. Von den insgesamt 464 gezeigten Genexpressionsverhältnisse sind nur 23 differentiel herauf- und zwei herabreguliert. Besonders auffällig ist, dass SFRP1 und SFPR3, mit Ausnahme der Zelllinie D9, bei allen Zelllinien differentiel heraufreguliert sind. Ebenso ist auffällig, dass FZD7 bei den Zelllinien D8 und D479A differentiel und bei allen anderen Zelllinien leicht herabreguliert ist. DKK1 (Dickkopf) ist bei vier der acht Zelllinien differentiel heraufreguliert (E273A, D257A, D479A und D590A). Bei der Zelllinie D8 sind noch zusätzlich zwei WNT Gene (WNT6 und WNT 7A) und FZD2 zu den bereits beschriebenen Genen differentiel heraufreguliert.

Nr.	Gen-symbole	D8		D370A		E273A		D257A		D9		D479A		MDA		D590A	
		Verhältnis	SD														
1	AMH	1,08	0,16	0,79	0,32	1,03	0,04	1,03	0,07	1,00	0,44	0,94	0,05	0,98	0,03	0,99	0,08
2	APC	1,19	0,77	0,86	0,43	0,91	0,16	0,96	0,18	0,93	0,19	0,98	0,09	0,86	0,14	1,05	0,14
3	APCL	0,99	0,05	0,88	0,22	1,13	0,07	1,14	0,02	1,00	0,14	1,15	0,13	1,00	0,08	1,17	0,05
4	ASCL1	1,12	0,24	1,08	0,43	0,93	0,13	1,00	0,07	0,94	0,36	0,94	0,08	0,90	0,28	0,91	0,16
5	AXIN1	1,02	0,08	0,93	0,48	0,98	0,07	1,06	0,05	0,91	0,11	0,91	0,06	0,98	0,04	1,07	0,10
6	COL2A1	0,92	0,12	0,95	0,23	0,98	0,06	0,90	0,06	1,01	0,32	0,92	0,14	1,27	0,35	0,90	0,05
7	CTNNB1	0,98	0,05	0,84	0,23	0,84	0,09	0,84	0,05	0,82	0,07	0,79	0,04	1,05	0,05	0,82	0,07
8	DKK1	1,21	0,36	1,12	0,09	2,32	0,27	2,58	0,42	1,04	0,17	4,15	0,51	1,06	0,31	2,07	0,55
9	DVL1	0,94	0,08	1,16	0,21	1,37	0,11	1,59	0,42	1,17	0,35	1,25	0,26	1,07	0,15	1,25	0,22
10	DVL2	0,93	0,10	0,97	0,22	0,99	0,09	0,92	0,10	1,05	0,13	1,01	0,08	0,96	0,08	1,02	0,09
11	DVL3	1,20	0,10	0,96	0,18	0,92	0,07	0,90	0,02	0,98	0,12	0,93	0,04	1,03	0,18	0,89	0,08
12	FGFR1	0,97	0,03	0,88	0,11	1,02	0,04	1,02	0,01	0,92	0,12	1,02	0,05	0,94	0,08	1,03	0,06
13	FRAT1	0,93	0,07	0,85	0,13	1,01	0,07	1,05	0,05	0,92	0,14	0,96	0,04	1,05	0,09	1,02	0,02
14	FRAT2	1,05	0,17	1,10	0,13	1,01	0,09	1,04	0,08	1,19	0,29	1,05	0,07	1,00	0,12	0,98	0,10
15	FZD1	0,95	0,08	0,91	0,17	0,85	0,05	1,05	0,11	0,92	0,16	1,07	0,10	0,95	0,04	0,98	0,03
16	FZD2	2,62	0,36	1,15	0,36	1,01	0,07	1,05	0,03	0,94	0,07	0,94	0,11	0,95	0,04	1,06	0,02
17	FZD4	0,81	0,05	1,04	0,22	0,89	0,15	0,85	0,02	0,84	0,06	0,96	0,06	0,95	0,01	0,97	0,05
18	FZD5	0,98	0,05	1,46	1,37	1,10	0,12	1,09	0,09	1,20	0,76	1,10	0,16	1,00	0,05	1,02	0,08
19	FZD6	1,01	0,03	1,17	0,57	1,35	0,06	1,29	0,18	1,07	0,44	1,31	0,12	1,03	0,02	1,37	0,10
20	FZD7	0,53	0,09	0,86	0,29	0,82	0,07	0,73	0,06	0,83	0,16	0,68	0,05	0,74	0,10	0,75	0,07
21	FZD8	1,11	0,30	1,01	0,34	1,22	0,18	1,13	0,18	1,09	0,30	1,10	0,11	1,33	0,44	1,11	0,25
22	FZD9	0,91	0,07	0,79	0,15	1,05	0,05	1,07	0,17	1,07	0,05	1,02	0,14	1,34	0,20	1,08	0,13
23	GPC3	1,04	0,13	0,78	0,44	0,89	0,05	0,94	0,06	1,00	0,11	0,94	0,12	1,03	0,09	0,93	0,12
24	IDAX	0,86	0,21	0,80	0,53	1,03	0,07	1,04	0,07	0,93	0,11	1,13	0,16	1,03	0,06	1,13	0,14
25	ILK	1,19	0,19	1,06	0,16	1,08	0,15	1,04	0,08	1,17	0,31	0,93	0,07	0,75	0,19	1,04	0,02
26	JUN	0,97	0,05	1,07	0,40	0,94	0,02	1,01	0,02	1,29	0,20	1,08	0,04	0,99	0,04	0,91	0,06
27	JUNB	1,03	0,01	0,90	0,11	1,16	0,08	1,03	0,10	1,14	0,29	1,02	0,09	1,01	0,04	0,99	0,07
28	LEF1	1,06	0,13	1,00	0,08	0,97	0,04	1,04	0,13	1,04	0,77	1,04	0,05	1,05	0,10	1,13	0,04
29	LFNG	0,97	0,03	0,92	0,10	1,21	0,09	1,07	0,18	0,97	0,21	1,21	0,20	0,98	0,06	1,18	0,32
30	MIF	1,35	0,49	0,96	0,16	1,16	0,06	0,97	0,09	0,98	0,21	1,03	0,06	0,85	0,23	1,12	0,18
31	MYF5	0,98	0,05	1,16	0,53	0,95	0,11	0,95	0,05	0,99	0,18	1,15	0,12	1,07	0,10	0,96	0,08
32	MYOD1	1,05	0,06	0,73	0,46	1,00	0,09	0,94	0,15	0,98	0,17	1,00	0,18	1,01	0,26	1,07	0,19
33	NOTCH1	1,06	0,12	0,72	1,13	1,01	0,05	0,98	0,06	0,88	0,32	0,99	0,04	0,92	0,26	1,01	0,04
34	PBX1	1,06	0,08	1,18	0,29	1,03	0,03	0,95	0,03	0,97	0,21	0,97	0,08	0,99	0,16	0,91	0,03
35	PITX2	1,06	0,07	0,84	0,31	0,99	0,04	1,03	0,06	0,92	0,15	0,97	0,16	1,00	0,03	0,96	0,04
36	PSEN1	0,86	0,06	1,15	0,09	0,99	0,07	1,03	0,05	0,99	0,17	0,96	0,10	0,96	0,03	0,99	0,01
37	PSEN2	1,07	0,09	1,26	0,18	1,03	0,08	1,05	0,08	1,00	0,07	1,05	0,11	0,96	0,13	1,05	0,11
38	RET	1,01	0,07	1,09	0,65	0,99	0,04	1,12	0,14	0,99	0,12	0,97	0,03	0,97	0,06	1,02	0,08
39	SFRP1	1,41	0,19	4,26	0,66	1,45	0,06	1,52	0,05	1,27	0,15	2,07	0,22	1,77	0,32	3,15	0,51
40	SFRP2	0,98	0,08	0,76	0,21	1,02	0,12	1,04	0,10	0,98	0,36	1,02	0,13	0,93	0,12	1,02	0,12
41	SFRP3	1,41	0,37	2,73	1,11	1,43	0,09	1,43	0,18	0,98	0,18	1,52	0,26	2,01	1,04	1,55	0,36
42	SFRP4	1,02	0,19	1,28	0,91	0,97	0,08	1,05	0,06	1,07	0,24	1,16	0,15	0,85	0,15	1,02	0,09
43	SFRP5	1,02	0,18	1,21	0,06	1,12	0,12	1,14	0,17	1,16	0,38	1,16	0,13	1,10	0,11	1,13	0,18
44	SMO	1,00	0,06	0,98	0,11	0,96	0,03	0,95	0,11	1,03	0,38	0,98	0,14	0,95	0,08	1,07	0,30
45	TCF1	1,02	0,02	0,79	0,14	1,06	0,16	1,08	0,12	0,96	0,09	0,91	0,05	0,98	0,12	0,99	0,05
46	TCF3	1,00	0,07	0,81	0,13	1,01	0,03	0,96	0,06	1,12	0,23	0,98	0,07	1,05	0,06	1,03	0,11
47	TCF7	1,02	0,08	0,82	0,22	1,01	0,16	1,08	0,23	1,17	0,27	1,06	0,15	0,95	0,04	1,09	0,25
48	TLE1	0,92	0,23	0,91	0,57	1,21	0,19	1,06	0,36	1,24	0,52	1,13	0,44	1,00	0,13	1,29	0,47
49	TLE2	0,85	0,10	1,24	0,32	1,21	0,11	1,14	0,19	1,12	0,35	1,16	0,38	0,99	0,04	1,25	0,27
50	WIF1	0,99	0,04	0,94	0,93	1,04	0,07	0,93	0,22	1,16	0,10	0,89	0,13	1,01	0,04	0,98	0,34
51	WISP1	0,97	0,08	0,94	0,31	0,96	0,02	1,08	0,10	1,07	0,25	1,09	0,04	1,03	0,06	1,09	0,12
52	WNT10B	1,10	0,10	1,21	0,41	1,04	0,29	0,87	0,18	0,86	0,27	1,00	0,16	1,02	0,14	1,02	0,20
53	WNT2	1,01	0,07	0,92	0,32	1,15	0,06	0,98	0,06	1,11	0,53	1,01	0,09	1,04	0,08	0,98	0,09
54	WNT2B	0,90	0,19	1,06	0,33	0,90	0,14	0,92	0,04	1,01	0,27	0,94	0,08	1,06	0,46	0,91	0,05
55	Wnt3	1,00	0,06	1,25	0,99	1,05	0,04	1,06	0,06	1,03	0,24	0,87	0,10	0,94	0,08	0,96	0,06
56	WNT5A	0,97	0,07	0,82	0,86	1,00	0,04	1,14	0,12	0,98	0,08	1,02	0,05	0,96	0,08	0,97	0,10
57	WNT6	1,42	0,22	0,92	0,25	1,26	0,16	1,25	0,10	0,99	0,13	0,80	0,12	0,99	0,24	0,85	0,06
58	WNT7A	2,28	0,54	1,04	0,29	1,06	0,07	1,02	0,03	0,89	0,12	0,98	0,07	0,94	0,30	1,00	0,05

**Tab. 9: E-Cadherin abhängige Genexpressionsveränderungen im vernetzten WNT**

Dargestellt sind die Genexpressionsverhältnisse von 58 Genen für alle acht Zelllinien. In weiß sind alle nicht differentiell exprimierten, in hellgrün die differentiell herabregulierten und in rot alle differentiell heraufregulierten Gene markiert. In olivgrün ist zusätzlich das schwach herabregulierte FZD7 hervorgehoben.

Die differentielle Expression von SFRP1 und SFRP3, die mittels der Mikroarray Analysen festgestellt wurde, wurde für die Zelllinien D8, D370A, D9 und MDA mittels Northern Blot Analyse überprüft. Die Ergebnisse hierzu sind in der Abb. 41A dargestellt. Es konnten die Mikroarray Daten sowohl für SFRP1 als auch für SFRP3 im Wesentlichen bestätigt werden. SFRP1 und SFRP3 zeigen eine differentielle Heraufregulierung bei den Zelllinien D8, D370A und MDA, nicht aber bei der Zelllinie D9 im Vergleich zur WT Zelllinie. Die mittels Northern Blot Analyse bestimmte differentielle Genexpressionen waren für beide Gene bei allen vier Zelllinien höher als die auf Mikroarray basierenden Genexpressionsunterschiede.



**Abb. 41: Mikroarray und Northern Blot Daten zur Expression von SFRP1 und SFRP3**

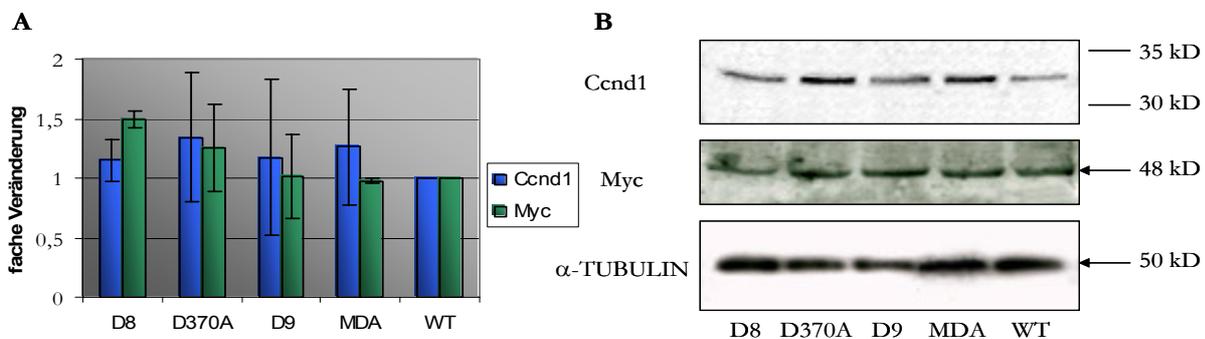
Dargestellt sind die Validierungen der Mikroarray Daten für SFRP1 und SFRP3.

A: Exemplarisch ist jeweils ein Northern Blot für SFRP1 und SFRP3 gezeigt und der dazu gehörende GAPD Abgleich. Insbesondere ist eine relative Heraufregulierung von SFRP1 und SFRP3 bei der D370A Zelllinie im Vergleich zur WT Zelllinie (WT = 1) zu erkennen.

B: Gezeigt ist eine Zusammenfassung der Northern Blot und Mikroarray Daten für die Zelllinien D8, D370A, D9, MDA und WT. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei Northern Blot Analysen und vier Mikroarray Experimenten für die Gene SFRP1 und SFRP3 dargestellt.

### 3.2 Proteinexpressionsdaten zu den Tcf/Lef transkribierten Genen

Neben den mRNA Expressionsanalysen mittels Mikroarray, Northern Blot Analyse und quantitativer realtime RT PCR wurde auch die Proteinexpression für die  $\beta$ -Catenin/Tcf/Lef transkribierten Gene CCND1 und MYC, die anhand der quantitativen realtime RT PCR nicht als differentiell detektiert wurden, mittels Western Blot Analyse bestimmt (für die Zelllinien D8, D370A, D9, MDA und WT). Es wurden für jede Proteinexpressionsbestimmung drei Western Blot Analysen durchgeführt. Als Abgleich wurde eine Western Blot Analyse mit  $\alpha$ -Tubulin verwendet. Abb. 42B dokumentiert, dass weder bei Ccnd1 noch bei Myc eine differentielle Proteinexpression vorhanden ist. Der Abgleich mit  $\alpha$ -Tubulin Western Blot Analysen zeigt eine geringere Proteingesamtmenge bei der D9 Zelllinie. Aber auch nach dem Abgleich mit  $\alpha$ -Tubulin war keine differentielle Expression für Ccnd1 und Myc nachweisbar (Abb. 42A).



**Abb. 42: Western Blot Analysen für Ccnd1, Myc und  $\alpha$ -Tubulin**

A: Mittelwert und Standardabweichung aus drei mit  $\alpha$ -Tubulin abgeglichenen Western Blot Analysen für Ccnd1 und Myc. Es wurde keine differentielle Proteinexpression detektiert.

B: Exemplarisch ist jeweils einer der drei durchgeführten Western Blots für die Gene Ccnd1, Myc und  $\alpha$ -TUBULIN abgebildet.

## 4 Expression von in der Wundheilung und Metastasierung involvierten Gene

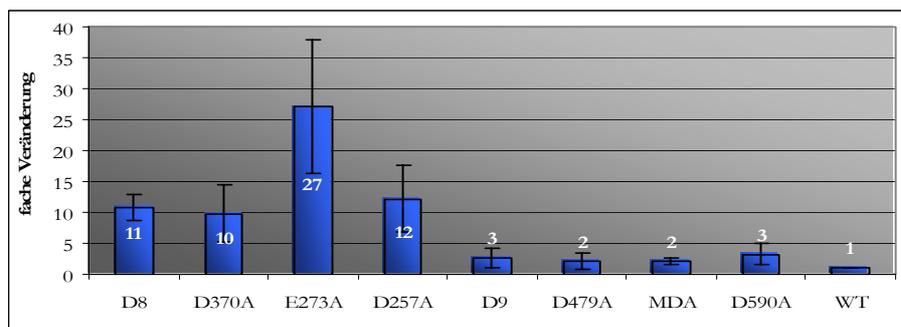
### 4.1 Differentielle Expression von MMP3, CYR61 und VEGFC

Wie schon in der Tab. 4 A und B gezeigt, ist ein großer Anteil der differentiell exprimiert gefundenen Gene bei den Zelllinien mit verminderter Adhäsion (mit Ausnahme der Zelllinie D8) an der Wundheilung beteiligt. Die differentielle Expression einiger der Wundheilungsgene, die zum großen Teil auch in der Metastasierung eine wichtige Rolle spielen, wurden mittels Northern Blot Analysen und/oder mittels quantitativer realtime RT PCR validiert (Tab. 5 und 6). Das am stärksten differentiell exprimierte Gen hierbei war MMP3. Die Validierung mittels quantitativer realtime RT PCR ergab bei allen Zelllinien mit Ausnahme von D590A eine differentielle Heraufregulierung von MMP3 und eine differentielle Herabregulierung bei der Zelllinie D9 (Tab. 6). Western Blot Analysen der Zellysate ergaben eine differentielle Heraufregulierung von Mmp3 über den Faktor 2 bei allen acht Zelllinien im Vergleich zur WT Zelllinie (Abb. 43). Besonders auffällig ist die starke Proteinexpression von Mmp3 bei den Zelllinien D8, D370A, E273A und D257A (Faktor 10-37), welche, wie schon oben beschrieben, ihre Zelladhäsion verloren haben. Hingegen ist die differentielle Heraufregulierung bei den Zelllinien mit Restadhäsivität deutlich geringer (Faktor 2-3).

A



B



**Abb. 43: Proteinexpression (im Zellysate) von Mmp3**

Die Mmp3 Proteinexpression im Zellysate wurde mittels Western Blot Analysen für alle 9 Zelllinien bestimmt.

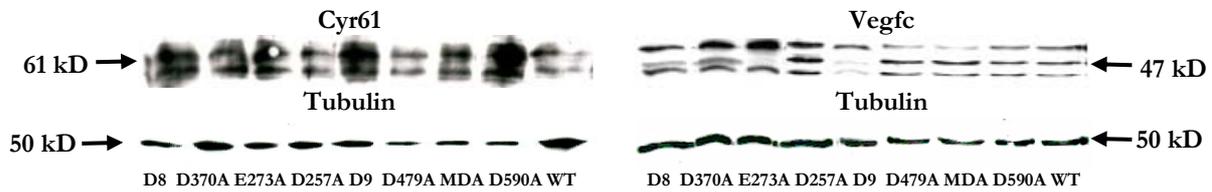
A: Western Blot Analysen von Mmp3 und  $\alpha$ -Tubulin

B: Veränderung der Mmp3 Proteinexpression der acht Zelllinien verglichen mit der WT Zelllinie ( $\alpha$ -Tubulin abgeglichenen Daten). Eine differentielle Heraufregulierung ist bei allen acht Zelllinien vorhanden. Insbesondere die vier Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt (D8, D370A, E273A und D257A) zeigen eine deutlich erhöhte Mmp3 Proteinexpression im Vergleich zu der WT Zelllinie.

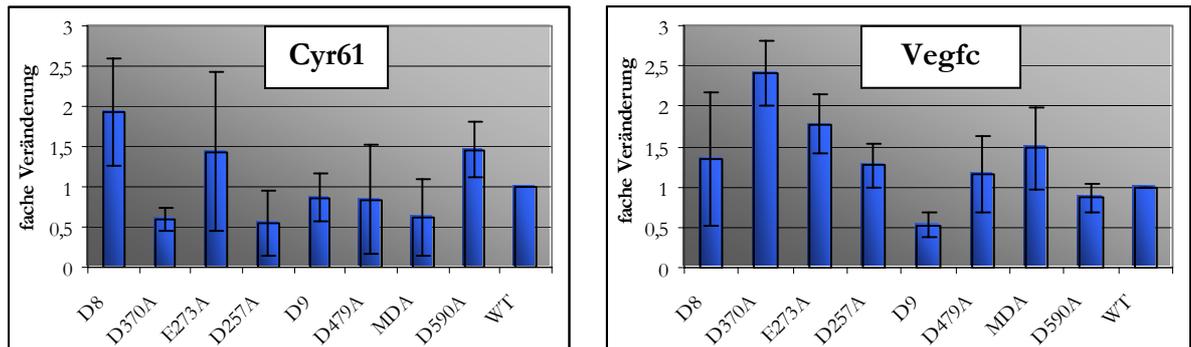
Die ebenfalls in der Wundheilung und Metastasierung involvierten Gene CYR61 und VEGFC zeigten bei den quantitativen realtime RT PCRs bei allen vier Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt ebenfalls eine differentielle Heraufregulation (Tab. 6). Eine differentielle Genexpression von VEGFC konnte bei allen vier nicht adhäsiven Zelllinien und bei der Zelllinie D479A detektiert werden. Bei CYR61 konnte ebenfalls eine differentielle Heraufregulierung bei den vier nicht adhäsiven Zellen und zusätzlich noch bei den Zelllinien D479A und D590A

nachgewiesen werden. Im Zelllysat konnte bei keiner der Zelllinien eine differentielle Cyr61 Proteinexpression (Verhältnis unter 0,5 oder über 2) detektiert werden (Abb. 44). Eine differentielle Proteinexpression für Vegfc war nur bei der Zelllinie D370A im Zelllysat nachweisbar. Eine leichte, nicht differentielle Erhöhung war ebenfalls in den nicht adhäsiven Zelllinien D8, E273A und D257A vorhanden.

A:



B:



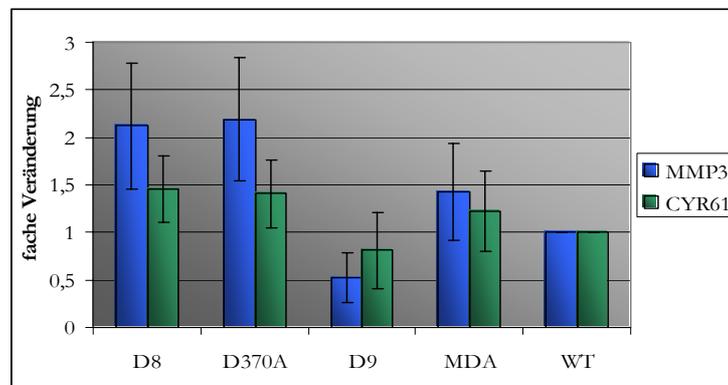
**Abb. 44: Proteinexpression (im Zelllysat) von Cyr61 und Vegfc**

Von allen neun Zelllinien wurde die Proteinexpression von Cyr61 und Vegfc im Zelllysat mittels Western Blot Analysen bestimmt.

A: Western Blot Analysen von Cyr61, Vegfc und  $\alpha$ -Tubulin

B: Veränderung Proteinexpression von Cyr61 und Vegfc bei allen acht Zelllinien verglichen mit der WT Zelllinie (abgeglichen mit  $\alpha$ -Tubulin). Eine differentielle Heraufregulierung bei Vegfc ist nur in der Zelllinie D370A erkennbar. Bei Cyr61 war keine differentielle Proteinexpression detektierbar. Es sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Western Blot Analysen gezeigt.

Da sowohl Mmp3 als auch Cyr61 sezernierte Proteine sind, wurde ebenfalls der Überstand im Zellmedium nach der Proteinexpression für die Zelllinien D8, D370A, D9, MDA und WT untersucht. Der Abgleich erfolgte mittels Coomassiegelen. Die Ergebnisse sind in der Abb. 45 dargestellt. Sezerniertes Mmp3 ist bei den Zelllinien D8 und D370A differenziell heraufreguliert und eine leichte Herabregulation ist bei der Zelllinie D9 zu erkennen. Cyr61 Protein ist hingegen auch im Überstand im Verhältnis zur WT Zelllinie bei keiner Zelllinie differentiel exprimiert. Nur eine schwache Heraufregulation von Cyr61 war bei den Zelllinien D8 und D370A detektierbar.

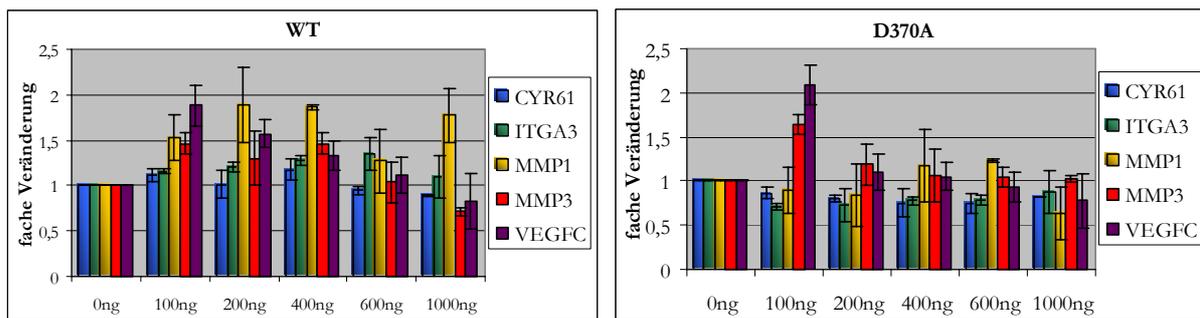


**Abb. 45: Proteinexpression von Mmp3 und Cyr61 im Zellüberstand**

Dargestellt ist die Proteinexpression von Mmp3 und Cyr61 im Zellüberstand für die Zelllinien D8, D370A, D9, MDA und WT, die mittels Western Blot Analyse festgestellt wurde. Der Abgleich erfolgte mittels Coomassiegelen. Während die Sekretion des Cyr61 Proteins bei allen fünf untersuchten Zelllinien in etwa identisch ist, kommt es zu einer erhöhten Expression des sezernierten Proteins Mmp3 bei den Zelllinien D8 und D370A.

## 4.2 Funktionsanalysen mit aufgereinigtem CYR61 Protein

Es ist beschrieben, dass Cyr61 einen regulativen Effekt auf unter anderem ITGA3, MMP1, MMP3 und VEGFC hat (Chen et al., 2001b). Um den Einfluss von Cyr61 auf die hier verwendeten Zelllinien zu untersuchen, wurden sowohl WT Zellen, die eine geringe CYR61 Genexpression hatten (Tab. 5 und 6), als auch D370A Zellen, die eine erhöhte CYR61 Genexpression zeigten (Tab. 5 und 6) mit aufgereinigtem Cyr61 Protein inkubiert. Die Zellen wurden mit fünf verschiedenen Cyr61 Proteinkonzentrationen (100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 600 ng/ml und 1000 ng/ml) 48 Stunden kultiviert. Mittels quantitativer realtime RT PCR wurde die Genexpression von CYR61, ITGA3, MMP1, MMP3 und VEGFC untersucht. Im Vergleich zu den Zellen, die nicht mit Cyr61 inkubiert wurden (0 ng/ml), sind die Gene MMP3 und VEGFC bei einer Cyr61 Konzentration von 100 ng/ml leicht heraufreguliert. Dieser Effekt war aber mit zunehmender Cyr61 Konzentrationen nicht reproduzierbar und bei 1000 ng/ml sind die beiden Gene sogar leicht herabreguliert (Abb. 46) Diese Effekte waren bei beiden untersuchten Zelllinien feststellbar. Bei den Genen CYR61, ITGA3 und MMP1 war keine veränderte Genexpression messbar. Zusammengefasst kann ausgesagt werden, dass die Inkubation mit Cyr61 Protein bis auf die schwachen Genexpressionsunterschiede von MMP1 und VEGFC bei einer Cyr61 Konzentration von 100 ng/ml keinen Effekt auf die Genexpression von CYR61, ITGA3, MMP1, MMP3 und VEGFC hat.



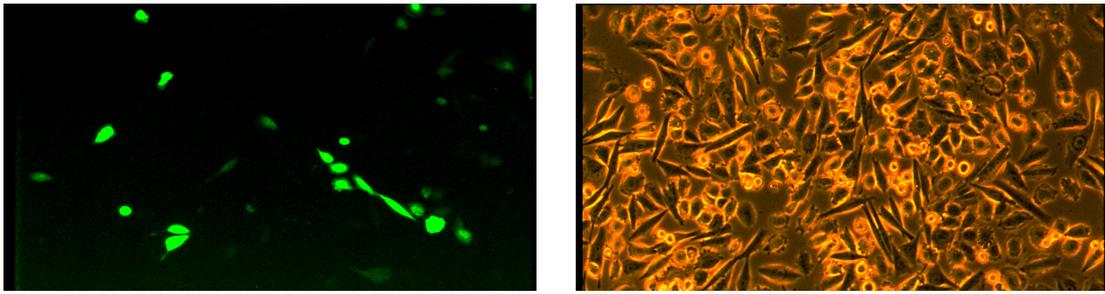
**Abb. 46: Inkubation von WT und D370A Zellen mit Cyr61 Protein in unterschiedlichen Konzentrationen**

Die Zelllinien WT und D370A wurden mit fünf verschiedenen Cyr61 Proteinkonzentrationen (100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 600 ng/ml und 1000 ng/ml) 48 Stunden inkubiert. Die Expression der Gene CYR61, ITGA3, MMP1, MMP3 und VEGFC wurden mittels quantitativer realtime RT PCR bestimmt. Keine Expressionsunterschiede sind bei CYR61, ITGA3 und MMP1 erkennbar, bei MMP3 und VEGFC hingegen ist eine schwache Genexpressionszunahme bei 100 ng bei beiden Zelllinien messbar, nicht hingegen aber bei weiter steigenden Cyr61 Proteinkonzentrationen.

## 4.3 Einfluss von CYR61 und CDH1 siRNA-Vektoren auf die Genexpression

Nachdem die Ergebnisse der Koinkubation mit Cyr61 Protein keine ganz klaren Ergebnisse lieferten, wurde die CYR61 Expression reprimiert, um den Einfluss von einer verringerter CYR61 Expression auf das Genexpressionsverhalten der Gene ITGA3, MMP1, MMP3 und VEGFC zu untersuchen. Dazu wurden die Zelllinien D8, D370A, MDA und WT mit unterschiedlichen CYR61 siRNA-Vektoren transfiziert.

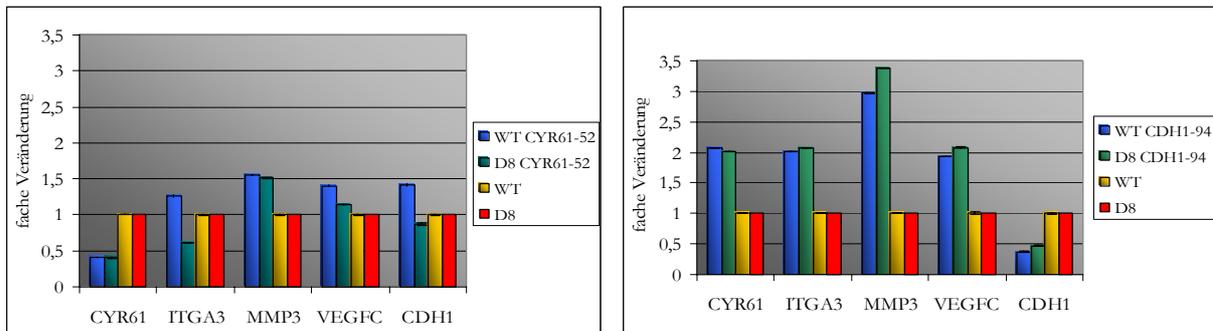
Um ein geeignetes Reagenz zur Transfektion der MDA-MB-435S Zellen mit siRNA-Vektoren zu finden, wurden Lipofektin, Lipofektamin, JetPei und Metafectene in unterschiedlichen Konzentrationen sowie Elektroporation mit dem EGFP-Vektor untersucht. JetPei (3,5 µl/ml JetPei und 1,5 µg/ml DNA) zeigte hierbei die höchste Transfektionsrate (15-20 Prozent) und hatte gleichzeitig die geringste Toxizität auf die Zellen (Abb. 47).



**Abb. 47: Transfektion der D8 Zelllinie mit EGFP**

Die Zelllinie D8 wurde mit 1,5 µg/ml EGFP Vektor und dem Transfektionsreagenz JetPei (3,5 µl/ml) transfiziert. Links sind die mit EGFP transfizierten Zellen in grün und rechts ist derselbe Bereich im Durchlichtmikroskop dargestellt. Die Transfektionsrate für das Transfektionsreagenz JetPei betrug 15-20 Prozent und war am effizientesten.

Da die siRNA-Vektoren kein eukaryotisches Resistenzgen hatten, wurde ein Puromycin Resistenzgen in die siRNA-Vektoren kloniert (die Zelllinien sind aufgrund der E-Cadherin Transfektion bereits Geniticin resistent). Um die Sensitivität der MDA-MB-435S Zellen auf Puromycin zu testen, wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Puromycinkonzentrationen durchgeführt. Sie ergab eine optimale Puromycinkonzentration von 2 µg/ml zur Selektion der Puromycin resistenten Zellen. Es wurden drei siRNA-Konstrukte gegen CYR61 in die WT und D8 Zelllinien transfiziert. Es wurde zusätzlich ein siRNA-Konstrukt gegen E-Cadherin (CDH1) in die Zelllinien D8 und WT transfiziert um festzustellen, ob die vorher beschriebenen differentiellen Genexpressionen aufgrund der E-Cadherin Mutationen an sich oder aufgrund des durch die E-Cadherin Mutationen verursachten Verlusts des Zell-zu Zellkontaktes verursacht werden. Nach der Selektion hatten ca. 70 % der puromycinresistenten, transfizierten Zellen das E-Cadherin Konstrukt verloren (dies war bei allen vier siRNA-Konstrukten der Fall). Die Zellen wurden deshalb nach der Transfektion mit DynaBeads nach E-Cadherin Expression gesortet (auch für die mit siRNA gegen CDH1 transfizierten Zellen wurden mit DynaBeads nach E-Cadherin gesortet, da aufgrund von vorangegangenen Experimente der Arbeitsgruppe KF Becker noch eine Restexpression von E-Cadherin erwartet wurde). Die Genexpression von CYR61 und CDH1 der gesorteten D8 und WT siRNA-Transfektanten wurde mit der Genexpression der ursprünglichen D8 und WT Zelllinien verglichen. Es konnte hierbei eine Herabregulation von CYR61 um ca. 60% mit dem siRNA-Konstrukt CYR61-52 festgestellt werden. Die Transfektion mit den Konstrukten CYR61-31 und CYR61-72 zeigte hingegen keinen Effekt auf die Genexpression von CYR61. Die Transfektion mit dem CDH1-94 Konstrukt bewirkte eine Abnahme von CDH1 um ca. 60 % im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen. Die Ergebnisse sind in der Abb. 48 dargestellt. Um festzustellen, ob CYR61 einen regulativen Effekt auf ITGA3, MMP3 oder VEGFC hat (Chen et al., 2001b), wurde die Expression dieser Gene ebenfalls mittels quantitativer realtime RT PCR untersucht. Die Gene ITGA3, MMP3 als auch VEGFC zeigten bei den CYR61 reprimierten Transfektanten keine differentielle Expression im Vergleich zu den ursprünglichen Zelllinien. Im Gegensatz dazu zeigten die Zelllinien, die mit dem CDH1-94 Konstrukt transfiziert wurden, nicht nur eine 60%tige Reprimierung der E-Cadherin Expression. Die Reprimierung des E-Cadherin bewirkte eine Heraufregulierung der Genexpression von den Genen CYR61 (2fach), ITGA3 (2fach), MMP3 (3fach) und VEGFC (2fach) sowohl bei der D8 als auch der WT Zelllinie. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass eine Reprimierung von CYR61 zu keiner Veränderung der Genexpression von ITGA3, MMP3, VEGFC und CDH1 führt. Hingegen führt eine Reprimierung von CDH1 zu einer Heraufregulierung der Gene CYR61, ITGA3, MMP3 und VEGFC. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Genexpressionsdaten von den Zelllinien mit gestörtem Zell-zu-Zellkontakt, bei denen ebenfalls CYR61, ITGA3, MMP3 und VEGFC heraufreguliert sind.



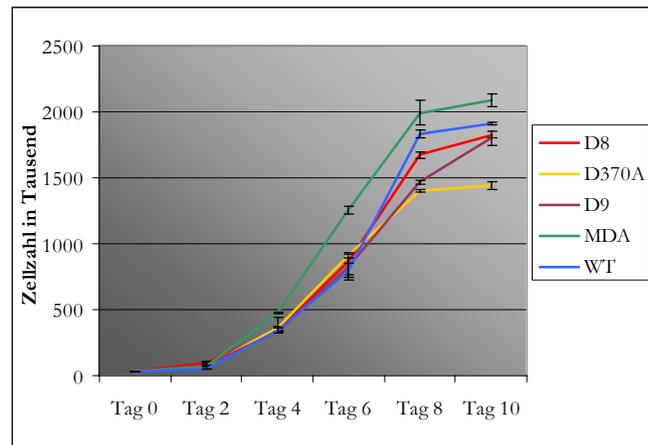
**Abb. 48: Expression von CYR61, CDH1, ITGA3, MMP3 und VEGFC bei den siRNA-Transfektanten**

Gezeigt ist die Veränderung der Genexpression der Gene CYR61, CDH1, ITGA3, MMP3 und VEGFC durch die Transfektion der Zelllinien WT und D8 mit dem CDH1-94 siRNA-Vektor und dem CYR61-52 siRNA-Vektor. Die Transfektion mit dem CYR61-52 siRNA-Vektor bewirkt eine Reprimierung von CYR61 und hat bei beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Genexpression von ITGA3, MMP3 und VEGFC. Die Transfektion mit dem CDH1-94 siRNA-Vektor zeigt bei beiden Zelllinien eine Reprimierung von CDH1 und gleichzeitig eine Heraufregulierung der Genexpression von CYR61, ITGA3, MMP3 und VEGFC.

## 5 Einfluss der Zelldichte auf das Genexpressionsprofil

In den vorhergehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass E-Cadherin einen Einfluss auf das Genexpressionsprofil hat. Es ist bekannt, dass E-Cadherin einen großen Einfluß auf den Zell-zu-Zellkontakt hat. Inwieweit die in den vorhergehenden Kapiteln gezeigten differentiellen Genexpressionen auf den unterschiedlich starken Zell-zu-Zellkontakt basieren oder ob das mutierte bzw. fehlendes E-Cadherin unabhängig vom Zell-zu-Zellkontakt hierfür verantwortlich ist, wurde mittels zweier Dichteversuche untersucht. In einer Versuchsreihe wurden die Zellen, abhängig von ihrer Zellwachstumskurve, in unterschiedlichen Zellzahlen ausgelegt und nach 2, 4 und 7 Tage Kultivierung (am 4. Wachstumstag wurde das Medium gewechselt) die RNA isoliert und mittels quantitativer realtime RT PCR auf Expressionsunterschiede hin untersucht. Bei der zweiten Versuchsreihe wurden die Zellen so ausgelegt, dass jeweils nach zwei Tage Kultivierung 20%, 50% und 80% Zelldichte erreicht wurde (bei allen bisherigen Versuchen wurde immer 80% Zelldichte verwendet). Die Genexpressionsunterschiede wurde ebenfalls mit quantitativer realtime RT PCR bestimmt und zusätzlich wurde das Genexpressionsprofil der Zelllinien D9 und WT für alle drei Zelldichten mittels Mikroarray Analyse untersucht.

Um die einzusetzende Zellzahl zu bestimmen, wurden Wachstumskurven für die Zelllinien D8, D370A, D9, MDA und WT erstellt. In der Abb. 49 sind die Wachstumskurven für zehn Tage dargestellt. Nach einer 1-2tägigen Anlauf (lag)-Phase folgte eine ca. sechstägige exponentielle Phase, die anschließend in eine stationäre Phase übergeht. Auffällig sind das beschleunigte Wachstum der untransfizierten MDA Zelllinie sowie der frühe Übergang der Zelllinie D370A in die stationäre Phase.

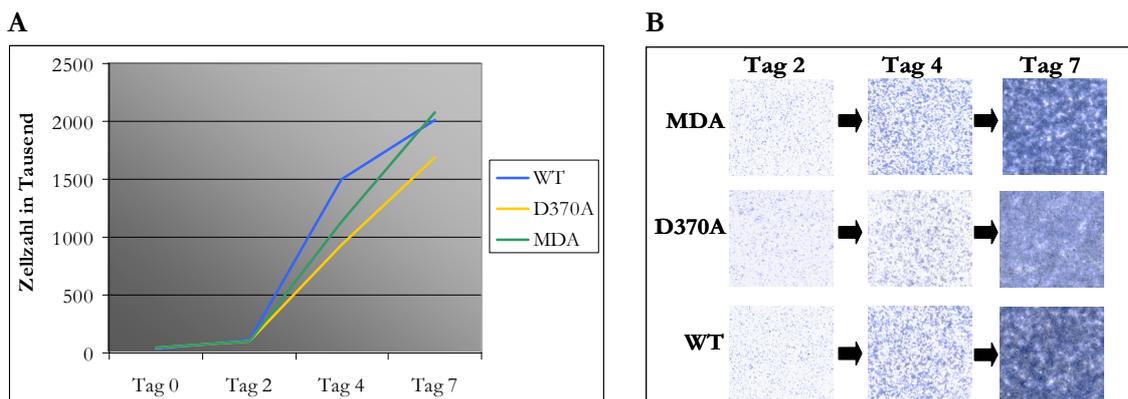


**Abb. 49: Wachstumskurve**

Gezeigt sind die Wachstumskurven der Zelllinien D8, D370A, D9, MDA und WT für 10 Tage. Es wurden am Tag 0 für jede Zelllinie 30.000 Zellen ausgesät. Die Zellen aus Ø 150 mm Zellkulturschalen wurden an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 10 trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Ermittlung der Wachstumskurven wurde dann 14 Tage später wiederholt und aus beiden Werten der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet.

## 5.1 Expressionsunterschiede bei Zellwachstum über sieben Tage

In der ersten Versuchsreihe zur Bestimmung des Einflusses der Zelldichte auf die Genexpression einiger ausgewählter Gene wurden von der schneller wachsenden MDA Zelllinie  $3 \times 10^4$  Zellen und von den langsamer wachsenden Zelllinien D370A und WT jeweils  $4 \times 10^4$  Zellen eingesetzt. Es wurde jeweils für die Tage 2, 4 und 7 die Zellzahl bestimmt, die Dichte mittels Diff-Quick Färbung abgeschätzt und RNA für quantitative realtime RT PCR isoliert. Aufgrund der unterschiedlich eingesetzten Ursprungszellzahlen am Tag 0 unterscheiden sich die Zellzahlen zwischen WT und MDA Zellen kaum. Die Zelllinie D370A wuchs hingegen etwas langsamer als die anderen beiden Zelllinien (Abb. 50) und die Zelldichte war etwas geringer. Die Ergebnisse hierzu sind in der Abb. 50 zu finden. In der Abb. 50B sind die Diff-Quick Färbungen der drei Zelllinien abgebildet. Die zunehmende Zelldichte ist gut erkennbar. Die Zellen sind am Tag 2. zu 30 Prozent, am Tag 4 zu 50 % und am Tag 7 zu 90 % dicht.



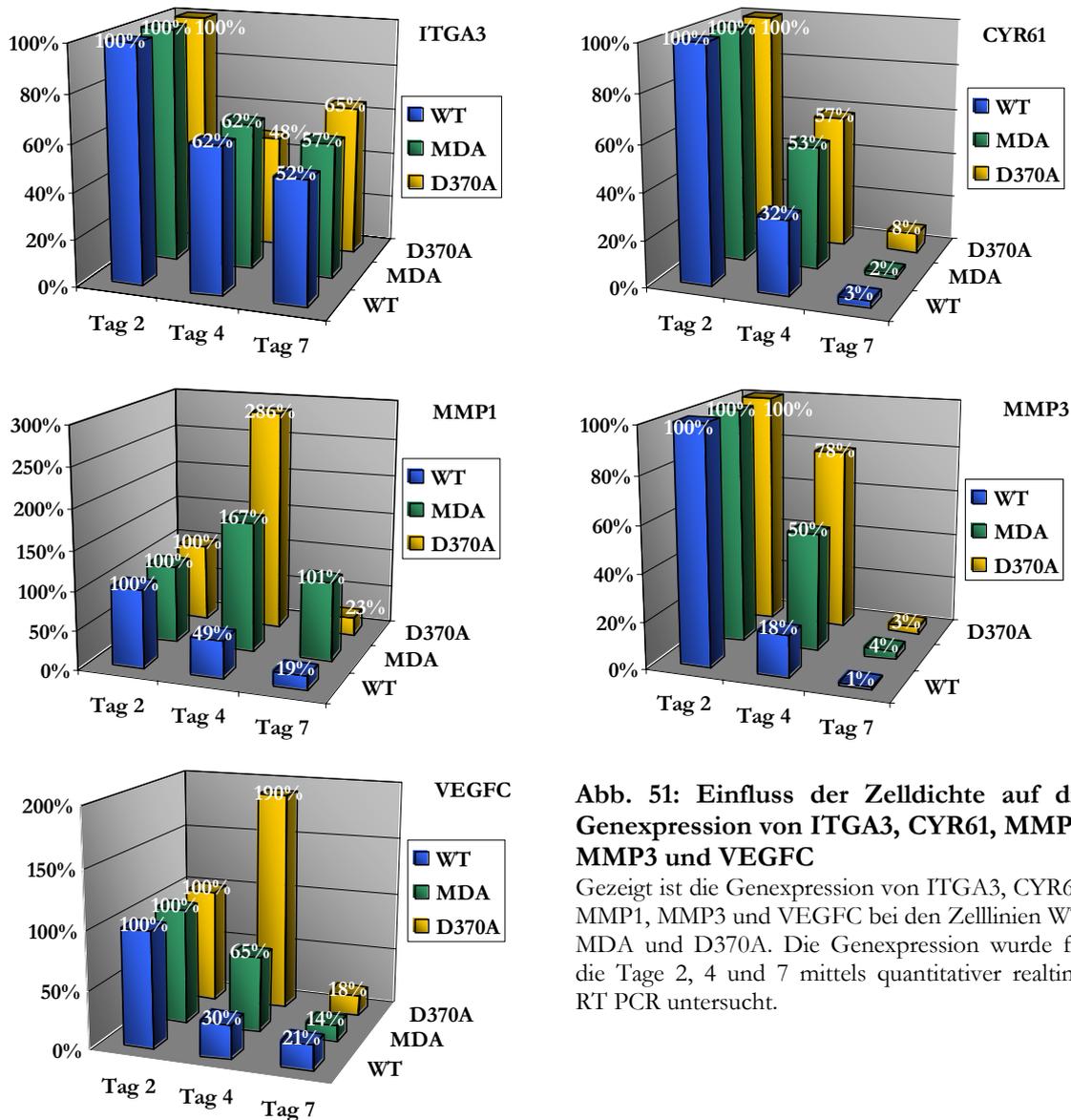
**Abb. 50: Zelldichteexperiment über 7 Tage**

A: Jeweils an den Tagen 2, 4 und 7 wurden die Zellen aus Ø 150 mm Zellkulturschalen trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Wachstumskurve ist für die Zelllinien WT, D370A und MDA dargestellt.

B: Die Zellen wurden mittels Diff-Quick auf Ø 150 mm Zellkulturschalen gefärbt und die Schalen anschließend eingescannt. Die zunehmende Zelldichte ist über die sieben Tage bei allen drei Zelllinien gut erkennbar.

Die Expression der Gene ITGA3, CYR61, MMP1, MMP3 und VEGFC, die bei den E-Cadherin defekten Zellen zuvor als differentiell exprimiert gefunden worden waren, wurde für die Tage 2, 4 und 7 mittels quantitativer realtime RT PCR bestimmt. Die Zellzahl am Tag 2 wurde, um den Einfluß der Zelldichte zu veranschaulichen, bei

allen drei Zelllinien als 100 Prozent gesetzt. Die Expression nimmt bei den fünf untersuchten Genen bei höherer Dichte ab. Dies gilt für alle drei Zelllinien. Eine Ausnahme bildet MMP1 bei den Zelllinien D370A (Tag 4) und MDA (Tag 4) sowie VEGFC bei der Zelllinie D370A (Tag 4). Die Herabregulation ist besonders bei den Genen CYR61 und MMP3 ausgeprägt (Herabregulation bis zu 99 Prozent) und ist ebenfalls bei den Genen MMP1 und VEGFC vorhanden. Eine weniger starke Herabregulierung ist bei dem Gen ITGA3 nachweisbar (Herabregulation auf 52-65 % im Vergleich zur Genexpression am Tag 2).



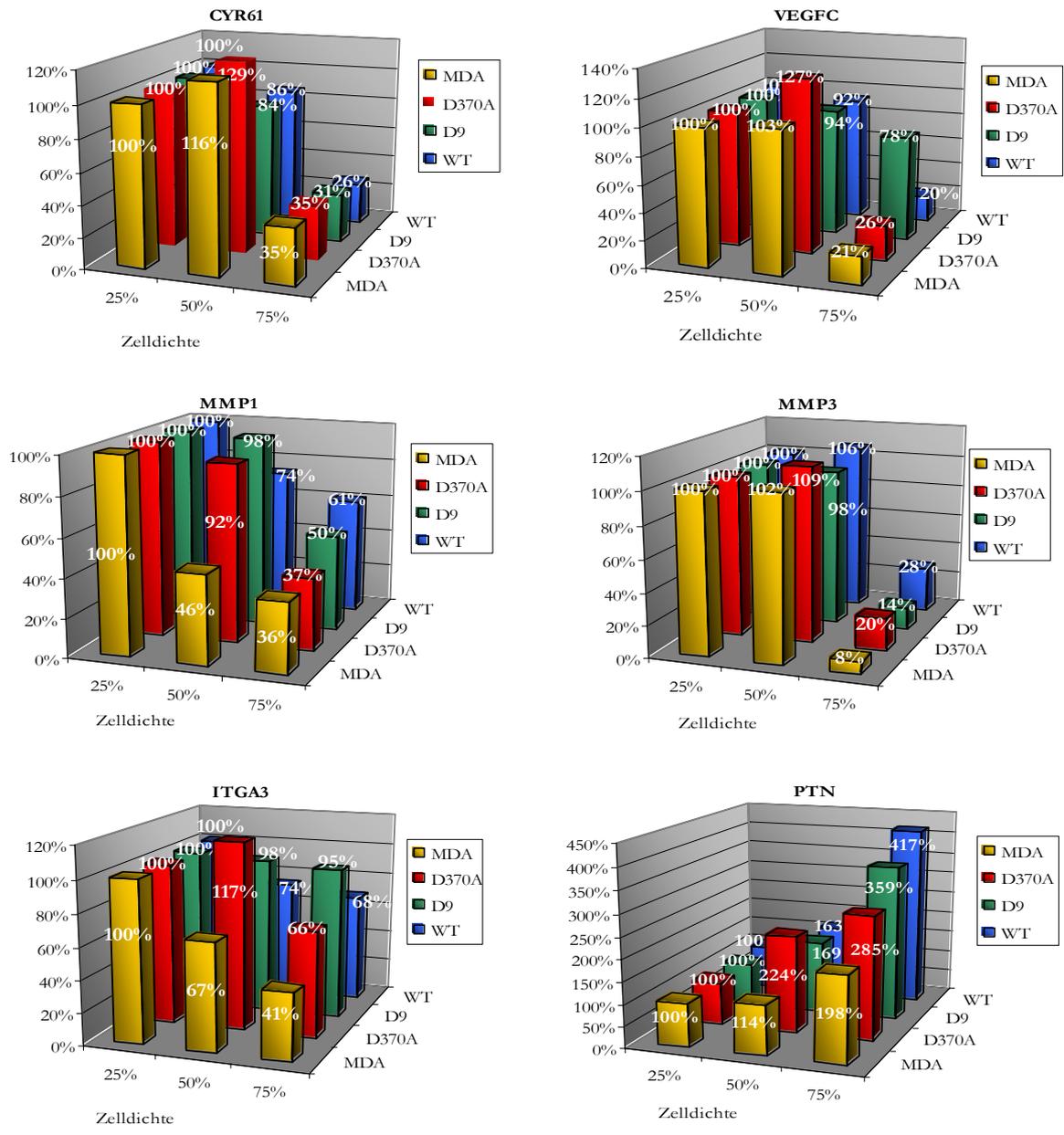
**Abb. 51: Einfluss der Zelldichte auf die Genexpression von ITGA3, CYR61, MMP1, MMP3 und VEGFC**

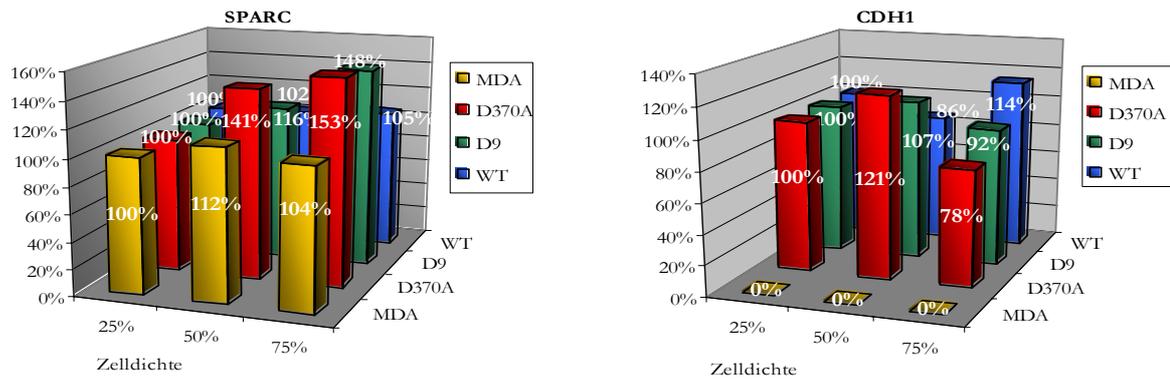
Gezeigt ist die Genexpression von ITGA3, CYR61, MMP1, MMP3 und VEGFC bei den Zelllinien WT, MDA und D370A. Die Genexpression wurde für die Tage 2, 4 und 7 mittels quantitativer realtime RT PCR untersucht.

## 5.2 Expressionsunterschiede bei drei unterschiedlichen Zelldichten

Die bei Kapitel 5.1 gezeigte Herabregulation der Gene ITGA3, CYR61, MMP1, MMP3 und VEGFC während der siebentägigen Kultivierungsdauer kann seine Ursache entweder in der Anhäufung sezernierter Proteine, der Veränderung des pH Werts im Medium und/oder des zunehmenden Zell-zu-Zellkontakt aufgrund der höheren Zelldichte haben. Um festzustellen, ob der Zell-zu-Zellkontakt hierfür verantwortlich ist, wurden die Zelllinien MDA, D9, WT und D370A so ausgelegt, dass nach zwei Tagen eine Zelldichte von 25 %, 50 % und 75 % erreicht wurde und somit Faktoren wie pH-Wert oder sezernierte Proteine aufgrund der verkürzten Kultivierungsdauer

wenig Einfluss haben. Bei 25 % Zelldichte haben die Zelllinien nahezu keinen Zell-zu-Zellkontakt, bei 50 % Zelldichte hat ein Teil der Zelllinien einen Zell-zu-Zellkontakt und bei 75 % Zelldichte haben fast alle Zellen zu mindestens einer weiteren Zelle Zell-zu-Zellkontakt. Die Genexpressionen wurden für die Gene CYR61, ITGA3, MMP1, MMP3, VEGFC, PTN, SPARC, und CDH1 mit quantitativer realtime RT PCR bestimmt. Eine Abnahme der Genexpression bei zunehmender Zelldichte wurde bei allen vier Zelllinien wieder für die Gene CYR61, ITGA3, MMP1, MMP3 und VEGFC detektiert. Eine Heraufregulation der Genexpression bei zunehmender Zelldichte konnte bei dem Gen PTN nachgewiesen werden. Die Gene SPARC sowie CDH1 sind nicht dichtereguliert (das transfizierte E-Cadherin besitzt einen  $\beta$ -Aktin Promotor). Die Ergebnisse sind in der Abb. 52 zusammengefasst.





**Abb. 52: Zusammenhang zwischen Genexpression und der Zelldichte für die Gene CYR61, ITGA3, MMP1, MMP3, VEGFC, PTN, SPARC, und CDH1**

Die Genexpression der Gene CYR61, ITGA3, MMP1, MMP3, VEGFC, SPARC, und CDH1 wurden für die Zelldichten 25 %, 50 % und 75 % mit quantitativer realtime RT PCR bestimmt. Die Genexpressionswerte für die Zelldichte 25 % wurden als 100% gesetzt.

Da die quantitativen realtime RT PCR Genexpressionsdaten des Dichteversuchs denen der Zelllinien mit gestörtem Zell-zu-Zellkontakt sehr ähnlich waren, wurde, um den Einfluss der Zelldichte auch auf weitere Gene zu untersuchen, das Genexpressionsprofil für die unterschiedlichen Dichten mittels Mikroarray Analyse untersucht. Es wurde das Genexpressionsprofil bei 25 % Zelldichte mit dem von 50 % und von 75 % Zelldichte verglichen (jeweils für die Zelllinien WT und D9). In der Tab. 10 sind die 20 am stärksten herauf- und herabregulierten Gene dargestellt. In grün sind die Gene markiert, die auch bei den vier Zelllinien mit gestörtem Zell-zu-Zellkontakt differentiell herab- und heraufreguliert waren (Tab. 4A). Insgesamt sind 38 % der in der Tab. 10 gezeigten Gene ebenfalls bei den Zelllinien mit gestörtem Zellkontakt differentiell exprimiert. Ein stärkerer Dichteunterschied (25% versus 75%) führt auch zu einem höheren Anteil differentiell exprimierter Gene. So sind bei einem Schwellenwert von unter 0,66 bzw. über 1,5 bei einem Signifikanzwert von 0,1 98 Gene bei D9 (25% versus 75% Zelldichte), aber nur 42 Gene (50% versus 75% Zelldichte) signifikant differentiell exprimiert. Bei der WT Zelllinie sind bei 25% versus 75% Zelldichte 22 Gene, bei 50% versus 75% Zelldichte aber nur 18 Gene signifikant differentiell exprimiert. Eine Gesamtliste des Genexpressionsstatus aller Gene ist auf der beigefügten CD unter den Ordner MDA-Dichteversuch zu finden.

WT 25% versus 75%		WT 50% versus 75%		D9 25% versus 75%		D9 50% versus 75%	
Genname	Verhältnis	Genname	Verhältnis	Genname	Verhältnis	Genname	Verhältnis
PRDX3	0,36	RBPSUH	0,52	HLA-DRA	0,52	HLA-DRA	0,56
HLA-DRA	0,42	MSH6	0,56	RPN2	0,53	LAMA4	0,57
MAP4K4	0,43	SMARCA3	0,57	SLC26A2	0,53	SLC26A2	0,60
NPM1	0,46	SLC26A2	0,57	PRKDC	0,55	ARHGEF6	0,64
TYK2	0,46	NPM1	0,58	CCNB2	0,57	RPN2	0,64
EP300	0,47	TOP2B	0,58	PI3	0,57	CCNG1	0,65
TOP2B	0,47	PCNA	0,59	LAMA4	0,59	PPM1B	0,66
MSH6	0,47	ARHGEF6	0,60	MAP4K4	0,60	FGF8	0,67
SMARCA3	0,48	LAMA4	0,60	FAM3C	0,64	STAT1	0,68
TOP2A	0,49	LGALS3	0,60	TOP2B	0,64	TNFRSF11B	0,69
PPP2R5C	0,49	MMP11	0,62	CAV-1	0,65	IRF4	0,69
LGALS3	0,50	CCNG1	0,62	ARHGEF6	0,65	MSH6	0,69
LAMA4	0,50	HSD17B4	0,62	SPRY2	0,66	FAM3C	0,69
PCNA	0,51	RBBP8	0,63	NPM1	0,67	PCNA	0,70
CCNB2	0,52	SKP1A	0,64	SPARC	0,67	HSD17B4	0,71
MMP23A	0,53	UBE2V2	0,66	CCNG1	0,67	TOP2B	0,71
PRKDC	0,54	TOP2A	0,66	PCNA	0,68	SKP1A	0,71
PSCD1	0,54	PRDX3	0,68	TNFRSF11B	0,69	LGALS3	0,71
RBPSUH	0,55	CUL1	0,69	GDI2	0,69	CYP27A1	0,72
FAM3C	0,55	KPNB1	0,69	PRKCD	0,69	SNCA	0,73
CTBP1	1,62	TLE2	1,48	NBS1	1,36	ITGA5	1,40
AP1B1	1,63	PLAUR	1,50	GJA1	1,37	PLAUR	1,41
QSCN6	1,66	CTBP1	1,51	POLH	1,38	KRT18	1,42
SURF2	1,71	CTSE	1,51	TLE2	1,38	SURF2	1,42
TLE2	1,72	SRF	1,51	SURF2	1,41	LASP1	1,43
CDC20	1,75	BAK1	1,51	CDC20	1,42	GRB2	1,43
IL4R	1,79	CYP17A1	1,52	SURF1	1,42	CAV1	1,44
DUSP8	1,82	HDGF	1,53	BCAR1	1,44	ITGA3	1,45
LASP1	1,86	QSCN6	1,55	NFKBIA	1,45	CCND1	1,46
SERPINE1	1,95	CCND1	1,55	SERPINE1	1,46	XRCC3	1,48
HDGF	1,95	TEAD4	1,59	MAPKAPK3	1,52	ELK1	1,48
CYP17A1	2,01	NF2	1,65	CLCA2	1,54	CYP17A1	1,62
CALCA	2,01	TP53	1,69	VEGFC	1,57	DVL1	1,64
ITGA3	2,16	KRT18	1,78	CYR61	1,71	TLE2	1,65
TEAD4	2,16	BCAR1	1,80	KRT18	1,71	MAPKAPK3	1,68
DKK1	2,33	DKK1	1,90	Rad54L	1,79	CYR61	1,72
KRT18	2,62	ERCC2	1,92	CYP17A1	1,89	BCAR1	1,77
CYR61	3,03	ITGA3	1,93	DNMT2	1,95	TEAD4	1,88
ERCC2	3,03	BCLX	2,32	TEAD4	1,95	BCLX	2,34
BCLX	3,52	CYR61	2,62	DKK1	2,50	DKK1	2,79

Tab. 10: Differenziell exprimierte Gene aufgrund unterschiedlicher Zelldichten

Die Tab. zeigt die 20 am stärksten herauf- und herabregulierten Gene bei unterschiedlichen Zelldichten für die Zelllinien D9 und WT. Es ist jeweils der Mittelwert der Verhältnisse zu 75% Zelldichte dargestellt. In grün sind die Gene markiert, die ebenfalls bei den Zelllinien D8, D370A, D257A und E273A differenziell exprimiert waren.

Die Validierung der Mikroarray Daten für die Zelldichte durch quantitative realtime RT PCR zeigte eine Übereinstimmung von 91%. Neun Prozent der Gene zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Bei diesen Genen handelte es sich um MMP1 und MMP3, die eine nur sehr schwache Genexpression zeigten und nicht mit dem Mikroarray detektiert werden konnten (siehe Tabelle 5).

Gene	WT 25%- 75%		WT 50%- 75%		D9 25%- 75%		D9 50%- 75%		WT	D9
	Microarray	Taqman	Microarray	Taqman	Microarray	Taqman	Microarray	Taqman		
CYR61	3,03	3,85	2,62	3,31	1,71	3,24	1,72	2,73	▲	▲
ITGA3	2,16	1,47	1,93	1,08	1,27	1,06	1,45	1,03	▲	▲
MMP1	0,80	1,65	0,92	1,22	1,13	2,02	1,02	1,98	▲	▲
MMP3	1,03	3,58	1,12	3,81	1,01	7,30	0,92	7,17	▲	▲
PTN	0,99	0,24	0,71	0,39	0,76	0,28	0,88	0,47	▲	▲
SNAI2	0,71	0,09	0,81	0,18	0,81	0,18	0,82	0,19	▲	▲
SPARC	0,88	0,96	0,98	0,97	0,67	0,67	0,79	0,78	▲	▲
VEGFC	1,16	5,11	1,25	4,69	1,57	1,29	1,34	1,21	▲	▲

Tab 11: Vergleich der Mikroarray Daten mit quantitativen realtime RT PCR Daten für unterschiedliche Zelldichten

Die Abbildung zeigt die Genexpressionsunterschiede jedes Gens der Zelllinien WT und D9 bei 25% oder 50% im Vergleich zu 75% Zelldichte. Grün markiert sind die Verhältnisse, die sich durch quantitative realtime RT PCR validieren ließen, und rot markiert sind die Verhältnisse, die sich im Bezug auf die Richtung der Genexpressionsunterschiede nicht validieren ließen. Die Dreiecke in der rechten Spalte zeigen an, ob bei zunehmender Zelldichte die Genexpression des jeweiligen Gen ab- oder zunimmt (die jeweils linken Dreiecke zeigen dies für die WT Zelllinie und die rechten Dreiecke für die D9 Zelllinie an). Bis auf MMP1 hat die Zelldichte den gleichen Effekt auf beide Zelllinien.

### 5.3 Einfluss der Zelldichte auf den WNT Signalweg

Unter den differenziell exprimierten Genen des Dichteversuchs befinden sich auch einige Gene, die im WNT-Signalweg involviert oder die Tcf/Lef reguliert sind. Es handelt sich hierbei um DKK1, DVL1, FZD2, SFRP1 und TLE2. Bis auf SFRP1 sind alle diese Gene heraufreguliert. Von den Tcf/Lef regulierten Genen ist die Genexpression von CCND1, CD44 und PLAUR heraufreguliert (Tab. 12). Zusätzlich zu den in der Tab. 12 gezeigten differenziell exprimierten Genen sind bei der WT Zelllinie im Vergleich 25% versus 75% Zelldichte noch die im WNT-Signalweg involvierten Gene MYOD1 (1,8 fach), WISP1 (1,45 fach) und WNT3a (1,6 fach) differenziell exprimiert.

Nr.	Gen-symbol	WT 25%			WT 50%			D9 25%			D9 50%		
		Verhältnis	SA	P-Wert									
1	DKK1	2,33	0,68	0,00	1,90	0,15	0,00	2,50	1,15	0,00	2,79	0,30	0,00
2	DVL1	1,53	0,26	0,02	1,39	0,20	0,02	1,21	0,33	0,26	1,64	0,44	0,03
3	FZD2	1,47	0,58	0,03	1,39	0,26	0,00	1,04	0,50	0,82	1,27	0,30	0,03
4	SFRP1	0,75	0,23	0,00	0,99	0,13	0,91	0,80	0,24	0,01	0,88	0,16	0,02
5	TLE2	1,72	0,49	0,03	1,48	0,05	0,00	1,38	0,28	0,05	1,65	0,54	0,05
6	CCND1	1,36	0,84	0,20	1,55	0,48	0,01	1,17	0,58	0,40	1,46	0,90	0,13
7	CD44	1,37	0,22	0,00	1,47	0,15	0,00	1,08	0,16	0,17	1,32	0,30	0,01
8	PLAUR	1,52	0,22	0,01	1,50	0,11	0,00	1,32	0,18	0,03	1,41	0,14	0,01

**Tab. 12: Aufgrund der Zelldichte differenziell exprimierte im WNT-Signalweg involvierte oder Tcf/Lef regulierte Gene**

Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen aufgrund der Zelldichte von Genen, die im WNT Signalweg involviert sind, oder von Tcf/Lef regulierten Genen. Grün sind die heraufregulierten Verhältnisse, rot die herabregulierten Verhältnisse markiert.

## 6 Expressionsprofil von E-Cadherin-Repressoren

### 6.1 Einfluss von E-Cadherin auf die Genexpression von E-Cadherin

#### Repressoren

Mittels Screening durch die Mikroarrays konnte des Weiteren festgestellt werden, dass das Gen SNAI2 (SLUG) bei allen Zelllinien mit Ausnahme der Zelllinie D590A herabreguliert ist. Diese Herabregulation konnte mittels quantitativer realtime RT PCR validiert werden. Basierend auf diesem Ergebnis wurde die Genexpression von fünf weiteren bekannten Genen für E-Cadherin Repressoren durch quantitative realtime RT PCR bei alle neun Zelllinien untersucht. Es handelte sich dabei um die Gene SNAI1, SIP1, TWIST1, ZEB1 und E12/E47. Die Ergebnisse sind in der Abb. 53 dargestellt. Fast alle E-Cadherin Repressoren sind in allen Zelllinien im Vergleich zur WT Zelllinie herabreguliert, nur SNAI1 ist bei den Zelllinien D9 und D479A und SNAI2 bei D590A heraufreguliert. Bei den Zelllinien D8 und E273A sind jeweils fünf der sechs E-Cadherin Repressoren differenziell (unter 0,5) herabreguliert. Bei der Zelllinie D8 konnte auch die stärkste quantitative Herabregulation der E-Cadherin Repressoren festgestellt werden (z.B. SNAI2: 8fach; SNAI1: 8fach; SIP1: 27fach; TWIST1: 11fach). Den geringsten Genexpressionsunterschied der E-Cadherin Repressoren zeigte die Zelllinie D370A, bei der nur SNAI2 differenziell herabreguliert ist, gefolgt von den Zelllinien D9 und D479A, bei denen jeweils ZEB1 und zusätzlich bei der Zelllinie D9 das Gen TWIST1 und bei der Zelllinie D479A das Gen E12/E47 differenziell herabreguliert sind. ZEB1 ist auch der einzige E-Cadherin Repressor, der bei sieben von den acht Zelllinien differenziell herabreguliert ist (keine

differentielle Expression bei D370A) gefolgt von SNAI2, der bei fünf der acht Zelllinien differentiell herabreguliert ist.

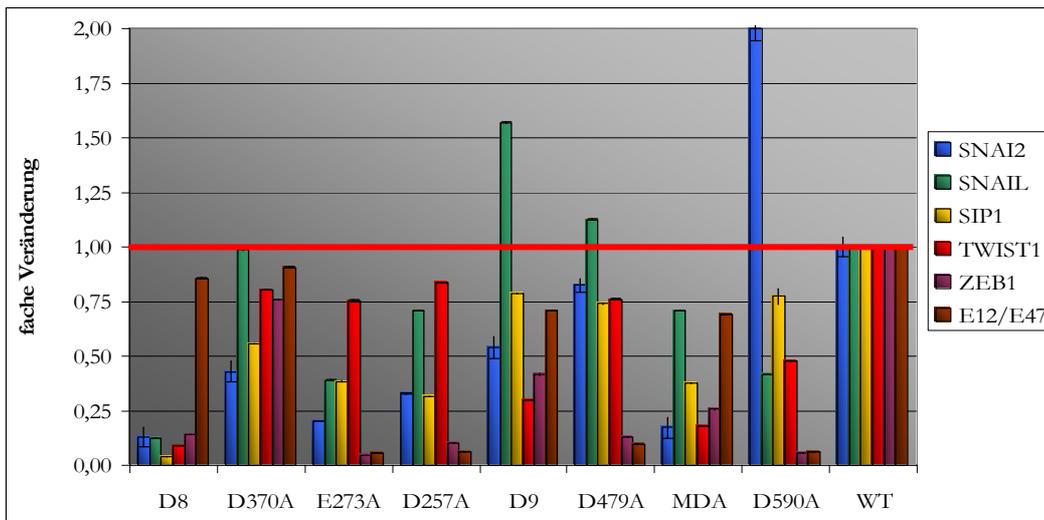
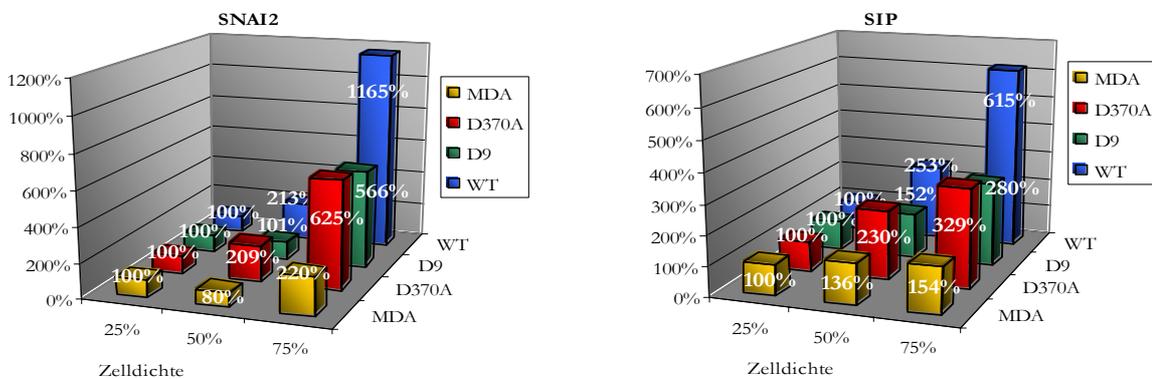


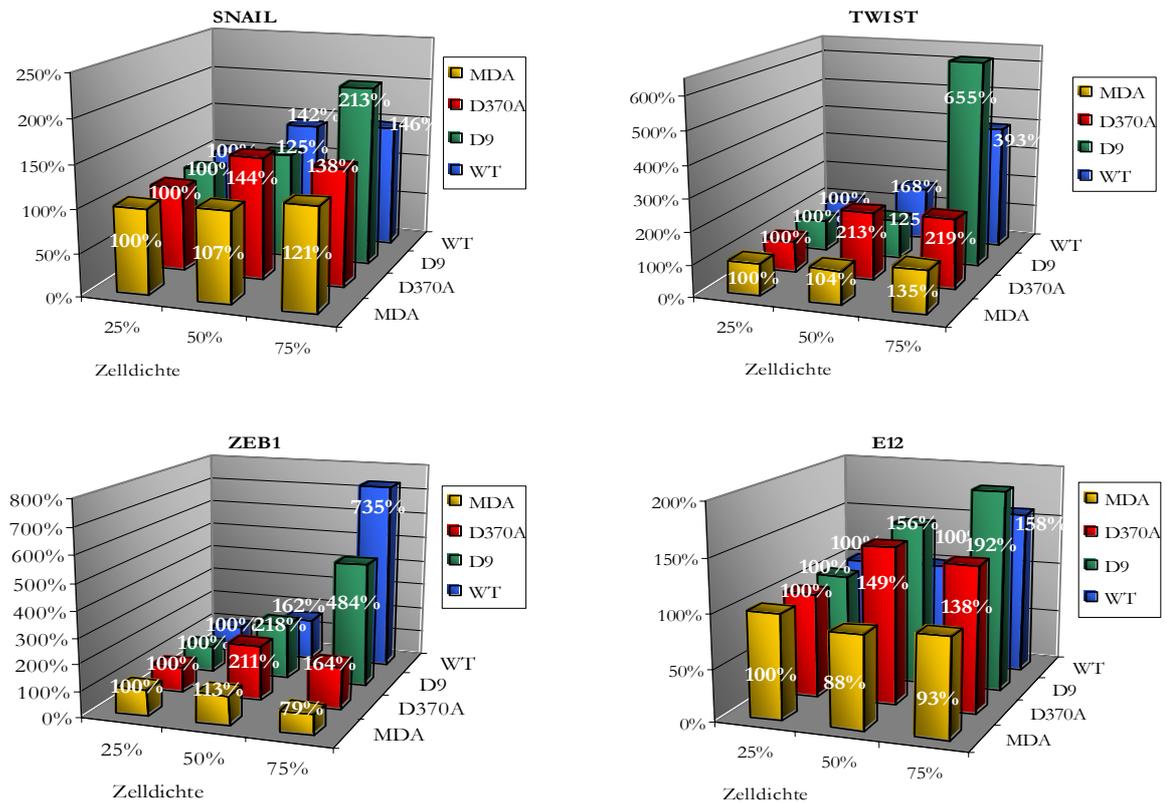
Abb. 53: Expression von E-Cadherin Repressoren

Die Expressionsunterschiede der Gene SNAI2, SNAIL, SIP1, TWIST1, ZEB1 und E12/E47 sind für alle acht untersuchten Zelllinien im Vergleich zur WT Zelllinie dargestellt. Bestimmt wurden sie durch quantitative realtime RT PCR.

## 6.2 Einfluss von unterschiedlichen Zelldichten auf die Genexpression von E-Cadherin Repressoren

Auch der Einfluss der Zelldichte wurde, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, auf die E-Cadherin Repressoren für die Zelllinien MDA, D9, WT und D370A bei den Zelldichten 25%, 50% und 75% bestimmt. Die Expressionsveränderungen der Gene SLUG, SNAIL, SIP, E12, ZEB1 und TWIST wurde hierbei mittels quantitativer realtime RT PCR detektiert. Eine Zunahme der Genexpression bei zunehmender Zelldichte wurde für alle Zelllinien für die Gene SLUG, SIP, TWIST nachgewiesen. Das Gen ZEB1 ist ebenfalls bei allen Zelllinien, mit Ausnahme der Zelllinie MDA, bei zunehmender Zelldichte heraufreguliert. Hingegen sind die Gene SNAIL und E12 nur bei der Zelllinie D9 heraufreguliert (Abb. 54). Auffällig ist auch, dass die stärksten Genexpressionszunahmen aller sechs E-Cadherin Repressoren bei den Zelllinien WT und D9, die beide adhäsive Eigenschaften besitzen, auftraten, und am geringsten bei der E-Cadherin negativen Zelllinie MDA waren.

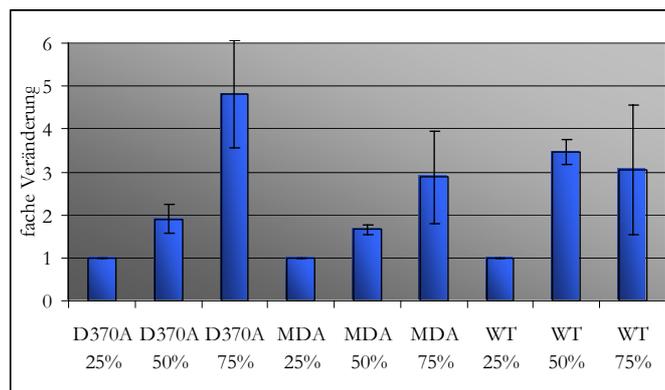




**Abb. 54: Einfluss der Zelldichte auf die E-Cadherin Repressoren SLUG, SNAIL, SIP, E12, ZEB1, TWIST**

Die Genexpressionsveränderungen bei zunehmender Zelldichte (Zelldichten 25 %, 50 % und 75 %) wurde für die Gene SNAIL2, SNAIL, SIP, E12, ZEB1 und TWIST mit quantitativer realtime RT PCR bestimmt. Die Genexpressionswerte für die Zelldichte 25% wurden als 100% gesetzt.

Um festzustellen inwieweit die Genexpression der E-Cadherin Repressoren mit der Proteinexpression korreliert, wurde die Proteinexpression von Snail bei den Zelllinien D370A, MDA und WT mittels dreier Western Blot Analysen bestimmt. Die Heraufregulation der Genexpression von SNAIL korreliert hierbei sehr gut mit der Proteinexpression. Bei allen drei Zelllinien nimmt die Proteinexpression von Snail mit zunehmender Dichte zu.

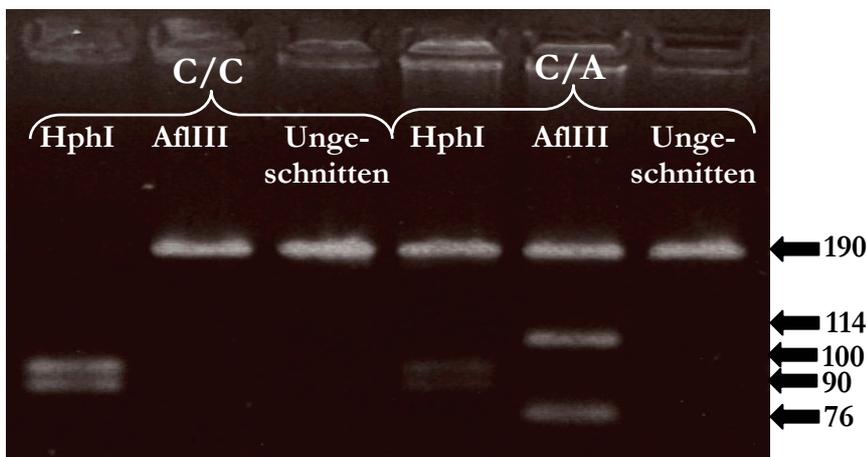


**Abb. 55: Veränderung der Proteinexpression von Snail im Bezug auf die Zelldichte**

Dargestellt ist die Veränderung der Proteinexpression von Snail in den Zelllinien D370A, MDA und WT bei 25%, 50% und 75% Zelldichte (abgeglichenen Daten mit  $\alpha$ -Tubulin). Eine Zunahme der Snail Proteinexpression bei höherer Zelldichte ist bei allen drei Zelllinien erkennbar.

## 7 Häufigkeit des E-Cadherin SNP-Polymorphismus an Position -160 in Magenkarzinomen

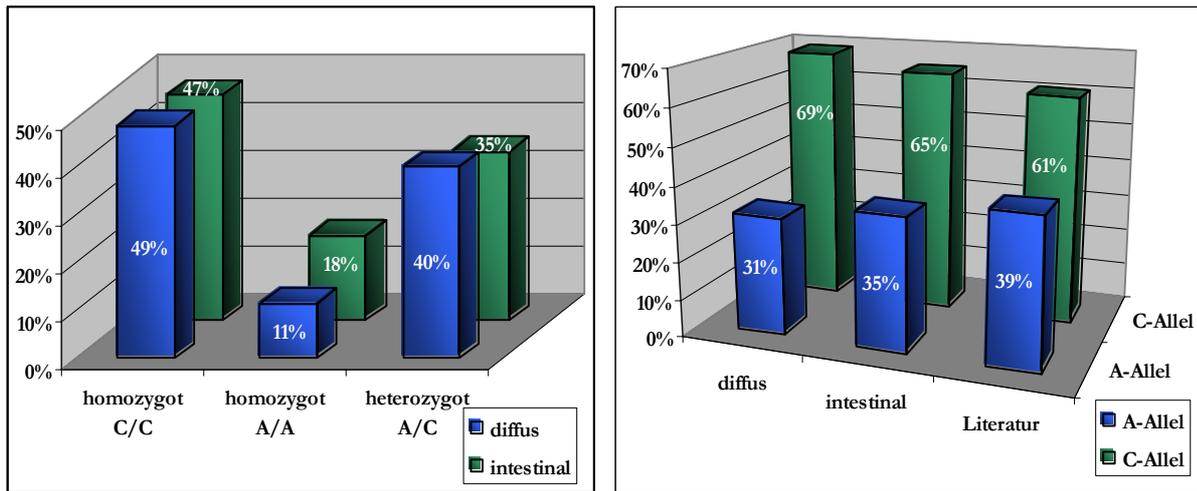
Die Häufigkeit eines C/A SNPs an der Position -160 des E-Cadherin Promoters wurde an diffusen und intestinalen Tumoren mittels RFLP Analysen untersucht und nach Korrelationen mit klinischen Parametern (z.B. Überlebensdauer, Metastasenbildung) gesucht. Die Tumor DNA wurde mittels PCR amplifiziert und mit den Enzymen HphI und AflIII verdaut. Das Ergebnis eines solchen Verdaues ist in der Abb. 56 gezeigt. In der Abb. 56 links (C/C) wurde das PCR Produkt mit HphI vollständig verdaut und war nach der Inkubation mit AflIII noch vollständig intakt. Diese Probe hat den homozygoten Status CC. Hingegen konnte das PCR-Produkt in der Abb. 56 rechts (C/A) sowohl mit HphI als auch mit AflIII geschnitten werden, in beiden Fällen war der Verdau aber nicht vollständig. Diese Probe ist im Bezug auf den SNP Status heterozygot.



**Abb. 56: RFLP Analyse**

Dargestellt ist der Restriktionsverdau des 190 bp langen PCR Fragments mit HphI und AflIII. Das C-Allel enthält eine HphI-Schnittstelle und das A-Allel eine AflIII-Schnittstelle. Der Verdau mit HphI führt zu zwei Fragmenten von 90 bp und 100 bp Länge und der Verdau mit AflIII zu einem 76 bp und 114 bp Fragment. Als Kontrolle wurde das PCR-Produkt jeweils auch unverdaut aufgetragen.

Es wurden insgesamt 17 intestinale und 35 diffuse Magenkarzinome mittels RFLP Analyse untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abb. 57 dargestellt. Bei den diffusen Magenkarzinomen waren 49% homozygot C/C, 11% homozygot A/A und 40% heterozygot A/C. Eine ähnliche Verteilung war bei den intestinalen Magenkarzinomen vorhanden. Bei diesen waren 47% homozygot C/C, 18% homozygot A/A und 35% heterozygot A/C. Auch bei der Häufigkeitsverteilung des C- und A-Allels waren keine großen Unterschiede zwischen diffusem und intestinalem Magenkarzinom detektierbar. Der Vergleich mit der Häufigkeitsverteilung in der Literatur zeigte ebenfalls keinen Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der Allele. Es gab keine Korrelation mit klinischen Parametern wie Metastasen, Überlebenszeit, Lymphknotenbefall, Rezidiven etc..



**Abb. 57: Häufigkeitsverteilung der A- und C-Allele im diffusen und intestinalen Magenkarzinom**

Die Abbildung zeigt links die Häufigkeit des homozygoten Status C/C, A/A und des heterozygoten Status A/C im diffusen und intestinalen Magenkarzinom. Die rechte Abbildung zeigt die Häufigkeitsverteilung des A- und C-Allels im Promotorbereich -160 von E-Cadherin.

## E Diskussion

Magenkarzinome gehören weltweit zu den zweithäufigsten Tumoren mit Todesfolge. Von etwa 1 Million Patienten, die jedes Jahr weltweit erkranken, versterben ca. 800.000 Menschen (WHO). Diese Zahlen verdeutlichen die Dringlichkeit, die Molekularbiologie dieser Karzinome genauer zu untersuchen. Diffus wachsende epitheliale Tumore, wie Magenkarzinome oder lobulärer Brustkrebs, infiltrieren das umliegende Gewebe als einzelne Zellen (Birchmeier and Behrens, 1994; Hirohashi, 1998; Oka et al., 1993). An diesem Vorgang ist insbesondere ein Verlust von Zell-zu-Zellkontakt beteiligt. Es wurden von Becker et al. (Becker et al., 1994) in ca. 50% der diffusen Magenkarzinome unterschiedliche Mutationen im kalziumabhängigen homophilen Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin entdeckt. Die homophile und kalziumabhängige Adhäsion wird über die extrazelluläre Region vermittelt. Die häufigsten Mutationen sind der Verlust von Exon 8 (D8) oder Exon 9 (D9) sowie eine Punktmutation im Exon 8 (D370A), die eine potenzielle Kalzium Bindungsstelle betrifft. Handschuh et al. wiesen mit E-Cadherin und mutierten E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen nach, dass E-Cadherin Mutationen zu einer Veränderung der Adhäsionseigenschaften, einer Erhöhung der Zellmotilität und einer Veränderung der Zellmorphologie führen können (Becker et al., 1994; Handschuh et al., 1999; Handschuh et al., 2001). Humane MDA-MB-435S Tumorzellen wurden als Empfängerzellen für die Transfektion mit E-Cadherin Expressionskonstrukten verwendet, da sie kein endogenes E-Cadherin exprimieren und bereits von anderen Arbeitsgruppen in Studien zur E-Cadherin Funktion durch Transfektion mit E-Cadherin Expressionskonstrukten erfolgreich verwendet wurden (Frixen et al., 1991; Meiners et al., 1998). So konnte Frixen et al. zeigen, dass die Subzelllinie MDA-MB-435S1 nach der Transfektion mit einem murinem E-Cadherin Gen das Maus E-Cadherin an den Zell-zu-Zellkontaktstellen exprimiert und die Invasivität der Zellen herabgesetzt ist. Es gibt aber bisher noch keine Erklärung für die Inaktivierung des E-Cadherins in der MDA-MB-435S Zelllinie (Hiraguri et al., 1998). Basierend auf den von Handschuh et al. (1999 und 2001) beschriebenen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit weiterführend der Einfluss dieser zum Teil Tumor assoziierten E-Cadherin-Mutationen auf das Genexpressionsprofil mittels cDNA Mikroarrays, Northern Blot Analysen und quantitativer realtime RT PCR untersucht. Da neben den E-Cadherin Mutationen auch die Zelldichte einen Einfluss auf den Zell-zu-Zellkontakt hat, wurde auch dieser Effekt auf Veränderungen im Genexpressionsprofil untersucht.

### 1. Mikroarrays

#### 1.1 Vergleich von unterschiedlichen cDNA Markierungsmethoden

Wichtig für die Zuverlässigkeit und die Reproduzierbarkeit der Mikroarray Daten sind die Qualität der beschichteten Objektträger, die Qualität und die Quantität der PCR-Produkte sowie die Integrität der RNA-Proben, die cDNA Markierungsmethode, das Hybridisierungsprotokoll, das Scannen (PMT und Laserstärke) und die Normalisierung. Für die cDNA Markierung gibt es vier verschiedene Methoden: die direkte und indirekte Markierung, die Markierung und Signalverstärkung mit Hilfe der Dendrimer- und der TSA-Technologie. Der Vergleich der direkten mit der indirekten Markierung in dieser Arbeit zeigte bei der indirekten Markierung sowohl eine höhere Varianz als

auch eine schlechtere Reproduzierbarkeit der Replikate. Auch war eine starke Streuung der schwach exprimierten Gene im Scatterplot der indirekten Markierung deutlich erkennbar (Abb. 29). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten von Badiée (Badiée et al., 2003). In dieser Arbeit zeigte die direkte Markierung deutlich bessere Ergebnisse als die indirekte Markierung von Kontrollgenen im Bezug auf die Standardabweichung, die Signifikanz und die Reproduzierbarkeit. In der Studie von Yu (Yu et al., 2002) wurden ebenfalls die direkte und indirekte Markierung miteinander verglichen. Die Scatterplots zeigten überraschenderweise sowohl bei der direkten wie auch bei der indirekten Markierung eine Verzerrung der Verhältnislinie in Richtung Cy5-Kanal, was bedeuten würde, dass Cy5 markierte Nukleotide besser als Cy3 markierte Nukleotide in der cDNA eingebaut werden. Dies ist widersprüchlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit und auch zu den Ergebnissen der aktuellen Literatur, in denen ein stärkerer Einbau von Cy3 Nukleotiden und ein schwächerer Einbau der „sperrigeren“ Cy5 Nukleotiden durch die reverse Transkriptase in die cDNA beschrieben wurde (Baugh et al., 2001; Benes and Muckenthaler, 2003; Kerr and Churchill, 2001b). Diese Publikation sowie die Publikation von Manduchi (Manduchi et al., 2002) konnten keinen signifikanten qualitativen Unterschied zwischen direkter und indirekter Markierung feststellen.

Alle diese Publikationen haben zusätzlich die Markierung mit TSA und Dendrimeren mit der direkten und indirekten Markierung verglichen. Sie konnten alle zeigen, dass die Markierung über Dendrimere der direkten und der indirekten Markierung im Bezug auf die Datenqualität überlegen ist. Auch muss bei der Dendrimer Technologie deutlich weniger Gesamt RNA verwendet werden (1 – 5 µg Gesamt RNA) als bei der direkten oder indirekten Markierung (10-50 µg). Die Markierung über TSA schnitt sowohl im Bezug auf die Datenqualität als auch im Bezug auf die Reproduzierbarkeit bei allen Publikationen schlecht ab. Der Vergleich zwischen direkter und indirekter Markierung lieferte bei fast allen Publikationen ähnliche Ergebnisse im Bezug auf die Qualität. Nur in der Publikation von Badiée et al. (2003) schnitt die direkte Markierung besser ab.

Das schlechte Abschneiden der indirekten Markierung im Bezug auf die Datenqualität in dieser Arbeit könnte auf die geringere Menge der eingesetzten RNA bei der indirekten Markierung zurückgeführt werden (direkte Markierung: 50 µg; indirekte Markierung: 20 µg). Die indirekte Markierung wurde in dieser Arbeit aufgrund des Vorteils der laut Anbieter geringeren einzusetzenden RNA-Mengen mit der direkten Markierung verglichen. Der deutlich erhöhte Hintergrund bei der indirekten Markierung, der sowohl beim Einsatz von 10 µg als auch bei 20 µg Gesamt-RNA vorhanden war, kann hingegen nicht mit der geringeren eingesetzten RNA Menge erklärt werden. Der hohe Hintergrund deutet darauf hin, dass noch ungebundenes Cy3 und Cy5 vorhanden ist und zum Teil „unspezifisch“ an die Aldehydoberfläche bindet. Die direkte Markierung hatte diese Probleme hingegen nicht und war qualitativ deutlich besser als die indirekte Markierung. Für zukünftige Arbeiten mit dem in dieser Arbeit etablierten cDNA Mikroarray sollte aber auch die Dendrimer Technologie mit der direkten Markierung verglichen werden. Ein Hauptnachteil der direkten als auch der indirekten Markierung ist die Abhängigkeit von der Effizienz der Inkorporation der modifizierten Nukleotide. Im Gegensatz hierzu ist die 3DNA Technologie nur abhängig von der Hybridisierungskinetik der Nukleinsäure. Auch könnte die einzusetzende Gesamt RNA Menge von 40 µg auf 1-5 µg herabgesetzt werden. Die 3DNA Technologie wurde in dieser Arbeit nicht verwendet, da sie zum Zeitpunkt der Etablierung der hier verwendeten Mikroarrays noch nicht verfügbar war.

## 1.2 Vergleich von unterschiedlichen Normalisierungsstrategien

Ein wichtiger Schritt in der Gewinnung von Genexpressionsdaten ist die Prozessierung der durch den Mikroarray gewonnenen Rohdaten. Hierbei versucht man mit Hilfe der Normalisierung die nicht biologischen Einflüsse (z.B. unterschiedliche Inkorporationseffizienz von Cy3 und Cy5 dCTPs oder ungleichmäßige Hybridisierung) aus den Rohdaten zu entfernen und den Vergleich von Mikroarray Daten aus unterschiedlichen Mikroarray Plattformen zu ermöglichen. So zeigten die im Rahmen dieser Arbeit hybridisierten Mikroarrays aufgrund der unterschiedlichen Inkorporation von Cy3- und Cy5-Nukleotiden immer ein deutlich stärkeres Signal im Cy3- als im Cy5-Kanal. Ein gewisser Ausgleich dieses Effekts konnte durch das Scannen mit einer schwächeren Laserintensität oder einer schwächeren digitalen Signalamplifikation erreicht werden. Trotzdem ist anhand des M versus A Plotts (Abb. 35) deutlich zu erkennen, dass die meisten Rohdaten in Richtung Cy3-Kanal verschoben sind. Dieser Effekt kann über die Annahme, dass beide Kanäle in der Summe die gleiche Signalintensität haben, korrigiert werden.

Diese Normalisierung, die den Median aller Werte von beiden Kanälen auf dasselbe Niveau bringt, ist die lineare Normalisierung. Anhand Abb. 35 B ist gut zu erkennen, dass alle Werte im M versus A Plot im Vergleich zu den unnormalisierten Daten in Richtung der Nulllinie verschoben sind und gemittelt Null ergeben. Es ist aber auch erkennbar, dass die Verhältnisfunktion weiterhin sigmoid und nicht linear verläuft. Sind die Daten, wie bei den hier verwendeten Mikroarrays, nicht linear verteilt, ist die lineare Normalisierung zur Datenprozessierung ungeeignet, und es können damit nicht alle nicht biologischen Effekte eliminiert werden. So war z.B. auffällig, dass die linear normalisierten Cy3/Cy5 Verhältnisse der Kontrollgene immer etwas höher waren als erwartet (Abb. 33). Die Ursache hierfür ist, dass jedes Kontrollgen immer in der gleichen Konzentration für die Cy3- und die Cy5-Markierungsreaktionen eingesetzt wurde, es also nie zum „Colorflip“ kommen konnte. Sowohl an den M versus A Plot als auch an den Verhältnissen der Kontrollgene kann man deutlich erkennen, dass die lineare Normalisierung zwar den unterschiedlichen Einbau der Cy3 und Cy5 dCTPs zum Teil ausgleicht, aber weiterhin noch systematische Messabweichungen vorhanden sind.

Weitere systematische Fehlerquellen, die durch Normalisierungen ausgeglichen werden müssen, sind z.B. nicht gut justierte Scanner, ungleichmäßiger Hintergrund oder unebene Hybridisierungen. Auch die Nadeln des Spotters können systematische Fehler verursachen, wenn z.B. die verwendeten Nadeln einen Defekt wie eine leichte Verbiegung haben. Um solche systematischen Fehler zu erkennen und gegebenenfalls mit bestimmten Normalisierungsparametern abzugleichen, wurden sowohl einzelne Housekeeping Gene als auch Kontrollgene bis zu 40mal gespottet um Unterschiede aufgrund von schlecht justierten Scannern, unebenen Hybridisierungen oder Pins zu erkennen. Es ist aber bei keinem der hier gezeigten Experimente zu einem dieser systematischen Fehler gekommen. Die sigmoide Form, die alle Datenpunkte des M versus A-Plots (Abb. 35) ergaben, beruht in erster Linie auf einer höheren Varianz bei den schwach exprimierten Genen. Die Ursache hierfür ist ein höherer additiver kanalspezifischer Fehler in diesem Bereich (Cui and Churchill, 2003). Für die ersten Experimente (D8, D370A, D9 und MDA) wurde anfangs linear normalisiert und die linearisierten Daten konnten mittels Northern Blot zu 84 % bestätigt werden. Hingegen wurde bei der nichtlinearen Normalisierung (Loess Normalisierung) eine Korrelation zwischen Northern Blot Daten und nicht linearisierten Mikroarray Daten von 89 % gefunden, die somit eher den realen Expressionsdaten entspricht. Bei der Loess-Normalisierung wurden die Cy3- und Cy5 Daten so abgeglichen, dass es bei dem M versus A Plot (Abb. 35) zu einer Mittelwertgeraden bei dem logarithmischen Verhältnis 0 kommt.

Dazu wurde eine Loess Kurve über die Daten berechnet und diese Kurve wurde dann von den log transformierten Verhältnissen subtrahiert. Der Vorteil der Loess Normalisierung ist, dass der Cy3/Cy5-Effekt nicht nur durch die Multiplikation mit einem einzelnen Faktor ausgeglichen wird, sondern dass sie nicht lineare Regressionsfunktionen, wie sie bei den hier verwendeten Mikroarrays vorkommen, ausgleicht (Abb. 35) (Edwards, 2003; Smyth and Speed, 2003).

Nach der Loess Normalisierung erfolgte eine „Median Absolute Deviation“ Scale Normalisierung. Hierbei wurden die Daten jedes Mikroarrays durch MAD (Median Absolute Deviation) dividiert, um unterschiedliche Mikroarray Experimente zu normieren. So entspricht eine z.B. 12fache Heraufregulierung eines Gens bei der D9 versus WT Hybridisierung der 8 fachen Heraufregulierung bei einer D8 versus WT Hybridisierung. Diese Varianzen zwischen den Mikroarrays wurden durch die MAD Normalisierung ausgeglichen, so dass unterschiedliche Mikroarray Experimente untereinander vergleichbar waren. Pro Experiment wurden vier kompetitive Hybridisierungen durchgeführt, um methodische Fehler zu erkennen und auszugleichen. Dabei waren „Colorflip“ Hybridisierungen für die Detektion und Eliminierung „nicht flippender Gene“ essentiell. Diese genspezifischen Farbeffekte können nicht durch Normalisierungen abgeglichen werden und bleiben sowohl nach der linearen als auch nach der Loess Normalisierung bestehen (Dobbin et al., 2003). Die Ursache dieser genspezifischen Farbeffekte ist bisher noch ungeklärt. Es ist auch nicht bekannt, ob diese genspezifischen Farbeffekte experimenteller Natur sind oder spezifisch für bestimmte Mikroarrays sind. Die meisten Studien sichern sich gegen genspezifische Farbeffekte durch "Colorflip"-Experimente ab (Barrans et al., 2002; Bayani et al., 2002; Desai et al., 2002; Zhou et al., 2002) oder führen genspezifische Abgleiche durch (Kerr and Churchill, 2001a; Tseng et al., 2001; Yang et al., 2002b). In der Regel betreffen diese genspezifischen Farbeffekte ca. 1% aller auf dem Mikroarray gespotteten Gene (Dobbin et al., 2003; Tseng et al., 2001). Damit liegen sie dann aber meistens über dem Schwellwert für differentiell exprimierte Gene und würden somit falsch in die Gruppe der differentiell exprimierten Gene eingestuft werden. Auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Mikroarrays hatten 1-2% der Gene einen genspezifischen Farbeffekt (Tab. 3). Aufgrund der Versuchsanordnung mit vier Mikroarrays je Experiment, wovon zwei im „Colorflip“ hybridisiert wurden, wurden diese Gene detektiert und für die weitere Auswertung nicht verwendet. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die bereits oben diskutierte Dendridomer Technologie, bei der keine modifizierten Nukleotide verwendet werden. Deshalb kommt es nicht zu unterschiedlichen Inkorporationen der beiden Farbstoffe.

### 1.3 Vergleich von unterschiedlichen Validierungen

Anhand der Validierungen sowohl mittels Northern Blot Analyse als auch quantitativer realtime RT PCR ist erkennbar, dass die gefundenen Genexpressionsverhältnisse von den Zelllinien mit mutiertem oder fehlendem E-Cadherin zu den WT transfizierten Zelllinien bei beiden Validierungsmethoden fast immer größer sind als bei den Mikroarrays. So wurde z.B. bei der Zelllinie D370A mittels Mikroarrays ein Verhältnis für MMP3 von 3,2 gefunden, die Validierung mittels quantitativer realtime RT PCR ergab hingegen 56,3. Das Gleiche gilt auch für herabregulierte Gene. So ergab z.B. die Mikroarray Analyse für das Gen PTN bei der Zelllinie D257A eine Herabregulation um den Faktor 2,94, die Validierung mittels quantitativer realtime RT PCR hingegen eine Herabregulation um den Faktor 50.

Die Ursache liegt darin, dass der Mikroarray im Bezug auf die relative Genexpression einen begrenzten Sensitivitätsbereich hat. Dies wird besonders bei den Kontrollgenen deutlich. Die großen CY3- zu Cy5 Verhältnisse der Kontrollgene 1, 2, 9, 10 konnten nicht detektiert werden (Abb. 33). Dies zeigt, dass der hier verwendete Mikroarray nicht sensitiv genug ist, das Ausmaß der Genexpressionsveränderungen exakt zu detektieren. Dass der dynamische Bereich bei Mikroarrays deutlich geringer ist als bei der quantitativen realtime RT PCR, ist in nahezu jeder Mikroarray basierten Publikation beschrieben (Pareek et al., 2005). Die Ursache liegt darin, dass die quantitative realtime RT PCR einen dynamischen Bereich von 7-8 logarithmischen Dekaden, der Mikroarray hingegen nur 2-3 logarithmische Dekaden hat (Bustin, 2000; Klein et al., 2001). Hingegen war der Mikroarray aufgrund der hohen Übereinstimmung (88% bzw. 94%) zwischen Mikroarray Daten und Northern Blot/quantitative realtime RT PCR Daten im Bezug auf die Richtung der Genexpressionsveränderung als Screening Methode sehr gut geeignet. Die Übereinstimmung zwischen quantitativer realtime RT PCR und Mikroarrays war mit 94% höher als zwischen Northern Blot Analyse und Mikroarray (88%). Die beiden Validierungsmethoden zeigten eine sehr hohe Korrelation im Bezug auf die Richtung der Genexpressionsänderungen mit Ausnahme des nur sehr schwach exprimierten Gens MMP1. Auch die Quantität der Verhältnisse für die einzelnen Gene korrelierte zwischen Northern Blot und quantitativer realtime RT PCR Analyse besser als zwischen einer der beiden Validierungsmethoden und der Mikroarray Analyse. Eine hohe Übereinstimmung zwischen den beiden Validierungsmethoden ist auch in der Literatur beschrieben (Iskandar et al., 2004; Pareek et al., 2005). Die hohe Übereinstimmung deutet darauf hin, dass mit beiden Methoden die „realen“ Genexpressionsveränderungen besser detektiert werden können. Die Pearsonkorrelation für den Vergleich der beiden Validierungsmethoden miteinander betrug 0,90 bei einem p-Wert unter 0,05, was ebenfalls eine hohe Übereinstimmung der beiden Validierungsmethoden zeigt. Anhand der Genexpression von MMP3 konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der quantitativen realtime RT PCR höher ist als die der Northern Blot Analyse. So konnte für die Zelllinien D9 und WT keine Genexpression des schwach exprimierten Gens MMP3 mittels Northern Blot Analyse detektiert werden, aber mittels quantitativer realtime RT PCR war eine Detektion von MMP3 bei beiden Zelllinien möglich. Dies entspricht den Daten von Bustin und Klein (Bustin, 2000; Klein et al., 2001), die zeigen konnten, dass die Sensitivität der quantitativen realtime RT PCR bei weniger als 5 Kopien liegt und dass die quantitative realtime RT PCR im Durchschnitt eine Standardabweichung von weniger als 2 Prozent hat. Aufgrund der höheren Sensitivität und der besseren Korrelation zu den Mikroarray Daten wurde der Großteil der Mikroarray Daten mittels quantitativer realtime RT PCR validiert.

## **2. Der Einfluss des Zellkontaktes auf den WNT Signalweg**

### **2.1 Der Einfluss von E-Cadherin auf den WNT Signalweg**

Nachdem durch die Validierungen mit Northern Blot und quantitativer realtime RT PCR gezeigt wurde, dass mit Hilfe der Loess Normalisierung herauf- und herabregulierte Gene der Mikroarrays im Bezug auf die Richtung der Genexpressionsveränderung richtig detektiert werden, wurde der Einfluss von E-Cadherin auf den WNT Signalweg untersucht. Ob E-Cadherin über  $\beta$ -Catenin einen Einfluß auf den WNT-Signalweg ausübt wird in der Literatur

kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite hat  $\beta$ -Catenin eine essentielle Rolle im Zell-zu-Zellkontakt und auf der anderen Seite ist es das zentrale Protein im WNT-Signalweg. Aufgrund der Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit E-Cadherin an der Zellmembran besteht die Annahme auf eine Beteiligung von E-Cadherin am WNT Signalweg.  $\beta$ -Catenin aktiviert WNT-Zielgene im Zellkern durch die Bildung eines transkriptionell aktiven Komplexes mit den Transkriptionsfaktoren Tcf/Lef. Zielgene sind unter anderen CCND1, TCF1, MYC und JUN.

Es ist beschrieben worden, dass  $\beta$ -Catenin in Melanomzelllinien im Exon 3 mutiert sein kann. So untersuchte Rubinfeld (Rubinfeld et al., 1997) 27 Melanomzelllinien und fand sechs Zelllinien, die eine Mutation im Exon 3 von  $\beta$ -Catenin an der N-terminalen Phosphorylierungsstelle hatten. Im Gegensatz hierzu wurde in den Studien von Demunter (Demunter et al., 2002) und Pollock (Pollock and Hayward, 2002) gezeigt, dass  $\beta$ -Catenin Mutationen nur sehr selten in Melanomzellen vorkommen. Da wie bereits oben beschrieben die MDA-MB-435S Zelllinie von einem okkulten Melanom abstammen könnte (Ellison et al., 2002; Ross et al., 2000), wurde im Rahmen dieser Arbeit das Exon 3 von  $\beta$ -Catenin der MDA-MB-435S Zelllinie sequenziert, um auszuschließen, dass die hier gezeigten Ergebnisse auf  $\beta$ -Catenin Mutationen basieren. Es konnten keine Mutationen festgestellt werden, und damit ist es unwahrscheinlich, dass die hier gezeigten Ergebnisse durch eine  $\beta$ -Catenin Mutation beeinflusst wurden. Orsulic et al. (Orsulic et al., 1999) beschrieben, dass E-Cadherin und Lef um  $\beta$ -Catenin konkurrieren. Sie konnten zeigen, dass es sowohl in E-Cadherin negativen embryonalen Stammzellen als auch in E-Cadherin negativen SW480 Kolon Karzinomzellen zu einer Anhäufung von freiem und mit Lef assoziiertem  $\beta$ -Catenin kommt. Die durch  $\beta$ -Catenin/Lef vermittelte Transaktivierung konnte durch eine transiente Expression von Wildtyp E-Cadherin in diesen Zellen gehemmt werden, aber nicht durch E-Cadherin mit einer fehlenden  $\beta$ -Catenin Bindestelle. Folglich hat E-Cadherin die Fähigkeit, freies  $\beta$ -Catenin an die Zellmembran zu rekrutieren und verhindert damit dessen nukleäre Lokalisation und damit seine Transaktivierungsaktivität.

Die Idee, dass der WNT Signalweg und E-Cadherin um denselben Pool von  $\beta$ -Catenin konkurrieren, basiert auf Forschungsergebnissen mit *Xenopus*. Die Expression von unterschiedlichen WNT-Genen in ventralen Blastomeren führte bei *Xenopus* zu einer Duplikation der Achsen (McMahon and Moon, 1989). Interessanterweise konnte derselbe Effekt auch durch ektopisches  $\beta$ -Catenin beobachtet werden (Funayama et al., 1995). Hingegen führte die Injektion von hohen Mengen ektopischen E-Cadherins zu einer Inhibierung der dorsalen Achsenbildung, was darauf hindeutet, dass E-Cadherin und der WNT-Signalweg um den gleichen Pool von  $\beta$ -Catenin konkurrieren (Fagotto et al., 1996; Heasman et al., 1994; Torres et al., 1996). Auch Gottardi (Gottardi et al., 2001) beschrieb einen Einfluss von E-Cadherin auf den WNT-Signalweg. Sie haben in ihrer Studie die E-Cadherin negative SW480 Kolon Karzinomzelllinie mit unterschiedlichen E-Cadherin Konstrukten transfiziert. Während die E-Cadherin Konstrukte mit einer  $\beta$ -Catenin Bindedomäne einen Effekt auf die Lef/Tcf Reportergenaktivität zeigten, hatten Konstrukte ohne  $\beta$ -Catenin Bindedomäne keinen Effekt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden MDA-MB-435S Zelllinien, die mit verschiedenen mutierten E-Cadherin Konstrukten transfiziert sind, mit WT E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen verglichen. Aber auch die untransfizierte und somit E-Cadherin negative MDA-MB-435S Zelllinie wurde mit der WT Zelllinie verglichen. Nach den oben beschriebenen Theorien wäre zu erwarten, dass es zu einer Heraufregulierung von Tcf/Lef regulierten Genen bei der E-Cadherin negativen MDA Zelllinie kommt, da E-Cadherin gebundenes  $\beta$ -Catenin jetzt

auch dem WNT Signalweg zur Verfügung stehen könnte. Ein ähnlicher Effekt könnte auch für die mit mutiertem E-Cadherin transfizierte Zelllinien zu erwarten sein, falls es aufgrund der Mutation zu Konformationsänderungen im cytoplasmatischen Bereich des E-Cadherin kommt und dadurch  $\beta$ -Catenin schwächer oder nicht gebunden werden kann. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Mikroarray Analysen 13 Tcf/Lef regulierte Gene bei allen acht Zelllinien untersucht. Nur wenige der Tcf/Lef regulierten Gene wurden hierbei als differentiell reguliert detektiert. Die Validierung durch quantitative realtime RT PCR für die Gene AXIN2, CCND1 und MYC (Abb. 40) als auch Western Blot Analysen der Proteine Ccnd1 und Myc (Abb. 42) zeigten keine differentielle Expression und bestätigten somit die Mikroarray Daten. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von Luber (Luber et al., 2000) überein, die die zelluläre Verteilung von  $\beta$ -Catenin in einigen der hier untersuchten Zelllinien analysiert hat.  $\beta$ -Catenin war, unabhängig vom E-Cadherin Status, an den lateralen Zell-zu-Zellkontaktstellen stabilisiert und wurde zusätzlich in den Zelllinien mit E-Cadherin Mutationen abnormal in der perinukleären Region gefunden. Aber in keiner der untersuchten Zelllinien wurde  $\beta$ -Catenin im Zellkern lokalisiert gefunden. Eine Erklärung hierfür ist die Expression von N-Cadherin, welches ebenfalls mit  $\beta$ -Catenin einen Komplex bilden kann und dadurch die Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern verhindert. N-Cadherin ist in allen untersuchten Zelllinien exprimiert (Mikroarraydaten). Eine weitere Erklärung basiert auf der differentiellen Expression von SFRP1 und SFRP3 (Abb. 41). Mit Ausnahme der Zelllinie D9, die sich im Bezug auf den Zell-zu-Zellkontakt ähnlich wie die WT Zelllinie verhält, sind SFRP1 und SFRP3 bei allen untersuchten Zelllinien heraufreguliert. Diese differentielle Expression wurde mittels der Mikroarray Analysen gefunden und mittels Northern Blot Analysen validiert. SFRPs sind sezernierte Moleküle, die die Fähigkeit besitzen, WNT Proteine zu binden und dadurch den WNT Signalweg zu inhibieren. Dadurch kommt es zu einer Abnahme von ungebundenem  $\beta$ -Catenin und einer Tcf basierenden Transkription (Bafico et al., 1999). Die Heraufregulation von den Genen SFRP1 und SFRP3 in den Zelllinien ohne oder mit defektem E-Cadherin könnte somit die fehlende oder reduzierte Fähigkeit von E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin an die Zellmembran zu binden, kompensieren und somit dessen nukleäre Lokalisation verhindern (Abb. 58).

In diesem Zusammenhang steht auch die Heraufregulierung von DKK1 in den Zelllinien E273A, D257A, D479A und D590A. Dkk1 ist ebenfalls ein sezerniertes Protein, das den WNT Signalweg inhibiert. Es bindet an Lrp5/6 und verhindert damit die Bildung des Liganden-Rezeptor Komplexes aus Wnt, Lrp5/6 und Fz, der für das Weiterleiten des WNT-Signalwegs in die Zelle benötigt wird (Bafico et al., 2001; Mao et al., 2001a; Semenov et al., 2001). Der WNT Signalweg ist dadurch unterbrochen und ungebundenes  $\beta$ -Catenin wird abgebaut (Mao et al., 2001a). Kürzlich wurde ein zweiter Mechanismus entdeckt, über den Dkk1 wirkt. Die intrazelluläre Domäne von Lrp5/6 interagiert durch die Bindung von Wnt mit Axin (Mao et al., 2001b), wodurch Axin degradiert wird. Dadurch kommt es nicht zu der Komplexbildung aus Gsk-3 $\beta$ , Apc und Axin, sodass  $\beta$ -Catenin nicht abgebaut werden kann. Durch die Bindung von Dkk1 an Lrp5/6 wird Axin nicht gebunden und abgebaut, und kann daher im Komplex mit Gsk-3 $\beta$  und Apc  $\beta$ -Catenin abbauen. Somit könnte durch die Heraufregulierung von DKK1 bei den Zelllinien E273A, D257A, D479A und D590A die fehlende oder reduzierte Fähigkeit von E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin an die Zellmembran zu binden, kompensiert werden (Abb. 58).

In allen acht untersuchten Zelllinien konnte zudem eine Herabregulation von FZD7 im Vergleich zur WT Zelllinie festgestellt werden. Fzd7 ist ein Rezeptor für WNT-Proteine und durch die Herabregulierung des Rezeptors kommt es zu einer verminderten WNT-Signal Übertragung in die Zelle, und  $\beta$ -Catenin kann stärker abgebaut werden. Auch

dies führt zu einer Kompensation der fehlenden oder eingeschränkten Fähigkeit des E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin an die Zellmembran zu binden (Abb. 58). Der E-Cadherin Status beeinflusst somit den WNT Signalweg, indem Gene wie SFRP1, SFRP3, FZD7 und DKK1 je nach E-Cadherin Status unterschiedlich exprimiert werden. Diese Expressionsunterschiede könnten durch eine Detektion von ungebundenem  $\beta$ -Catenin in den E-Cadherin defekten Zellen verursacht sein, denn alle diese differentiell exprimierten Gene sorgen für einen stärkeren Abbau des  $\beta$ -Catenins und kompensieren somit den Überschuss des nicht an E-Cadherin gebundenen  $\beta$ -Catenins im Cytoplasma. Dadurch ist auch keine differentielle Expression der Tcf/Lef regulierten Gene detektierbar.

Marc van de Wetering (van de Wetering et al., 2001) beschrieb ebenfalls, dass E-Cadherin keinen Einfluss auf Tcf regulierte Gene hat. Es wurde in dieser Studie ein TCF Reporter gen transient in 15 Brustkrebszelllinien transfiziert und weder in Zelllinien mit mutiertem E-Cadherin noch in Zelllinien, in denen E-Cadherin transkriptionell herabreguliert ist, konnte eine Tcf vermittelte transkriptionelle Aktivierung festgestellt werden. Dies entspricht dem Ergebnis dieser Arbeit, dass die unterschiedlichen E-Cadherin Varianten oder das gänzliche Fehlen von E-Cadherin nahezu keinen Effekt auf die 13 Tcf/Lef transkribierten Gene hat. Ähnliche Effekte wurden in der Publikation von Caca (Caca et al., 1999) beschrieben, bei der die Tcf abhängige Transkription bei reduzierter oder fehlender E-Cadherin Expression in Magen, Brust und Pankreas Karzinomzelllinien untersucht wurde. Der Verlust der endogenen E-Cadherin Expression war nicht verbunden mit einer Erhöhung des  $\beta$ -Catenin Spiegels und konstitutive Tcf transkriptionelle Aktivität konnte in diesen Zellen nicht detektiert werden, was ebenfalls mit den Daten dieser Arbeit im Einklang steht.

Wie schon vorher beschrieben, bewirkt die Herabregulierung von FZD7 eine Herabregulierung des WNT Signals und kompensiert damit das durch mutiertes oder fehlendes E-Cadherin freigesetzte  $\beta$ -Catenin durch einen stärkeren Abbau. Fzd7 selbst ist ein Target des WNT Signalwegs und reguliert sich somit auch selbst. Die Herabregulation von FZD7, die in allen Zelllinien im Vergleich zur WT Zelllinie auftrat, könnte auf ein „ $\beta$ -Catenin Überwachungssystem“ zurückzuführen sein, das auf die FZD7 Transkription Einfluss nimmt.

In der Zelllinie D8 ist zusätzlich die Expression der Gene WNT6 und WNT7A heraufreguliert. Bei Ohira (Ohira et al., 2003) wurde beschrieben, dass Wnt7a in Lungenkrebszelllinien über den WNT Signalweg die E-Cadherin Expression heraufreguliert und an einem positiven Feedback Loop beteiligt ist. Dass E-Cadherin zu den Wnt Zielgenen gehört, ist bei Drosophila schon seit längerem bekannt (Bradley et al., 1993; Hinck et al., 1994; Yanagawa et al., 1997). Die Theorie ist, dass fehlendes oder verringertes E-Cadherin an der Zelloberfläche zu einer Erhöhung von freiem  $\beta$ -Catenin führt, was dann zu einer Erhöhung der E-Cadherin Expression und letztendlich wieder zu einer Verringerung des  $\beta$ -Catenin Pools führt. E-Cadherin könnte sich somit selber regulieren. Diese Autoregulation ist in den hier untersuchten Zelllinien aber nicht möglich, da das exogene, transfizierte E-Cadherin über einen artfremden  $\beta$ -Aktin Promoter verfügt und somit nicht über Tcf/Lef transkribiert wird.

Die Heraufregulation von drei der Tcf/Lef regulierten Genen in der D8 Zelllinie (BMP4, CD44 und MYC) könnten durch eine 1,7fach erhöhte Expression von MADH3 verursacht worden sein (Mikroarray Expressionsdaten, siehe Anhang...). Madh3 wirkt als transkriptioneller Komodulator und reguliert die Genexpression durch Interaktion mit Lef/Tcf und  $\beta$ -Catenin am Xtn Promoter. Dies hat einen synergistischen Effekt und fördert die Transkription. Zu einer schwächeren Transkription der gleichen Zielgene kommt es durch Madh3/4 oder  $\beta$ -Catenin alleine (Labbe et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass die Madh3/4 Regulation durch ein 8 bp langes SBE (Smad binding element),

welches spezifisch durch Madh3/4 gebunden wird, erfolgt (Zawel et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vorgeschalteten regulatorischen Sequenzen von Tcf/Lef regulierten Genen untersucht. Zwei oder mehr SBEs korrelieren mit einer stärkeren Bindungseffizienz zu Madh3. In den 5000 bp langen Sequenzen vor den untersuchten Tcf/Lef regulierten Genen konnten zwei oder mehr SBEs bei BMP4, CD44, MYC und VEGF gefunden werden, nicht aber bei den anderen zehn Tcf/Lef transkribierten Genen. Somit können die kontroversen Hochregulierungen von BMP4, CD44 and MYC in der D8 Zelllinie durch eine Heraufregulierung von MADH3 erklärt werden, die ebenfalls nur in der D8 Zelllinie vorkam.

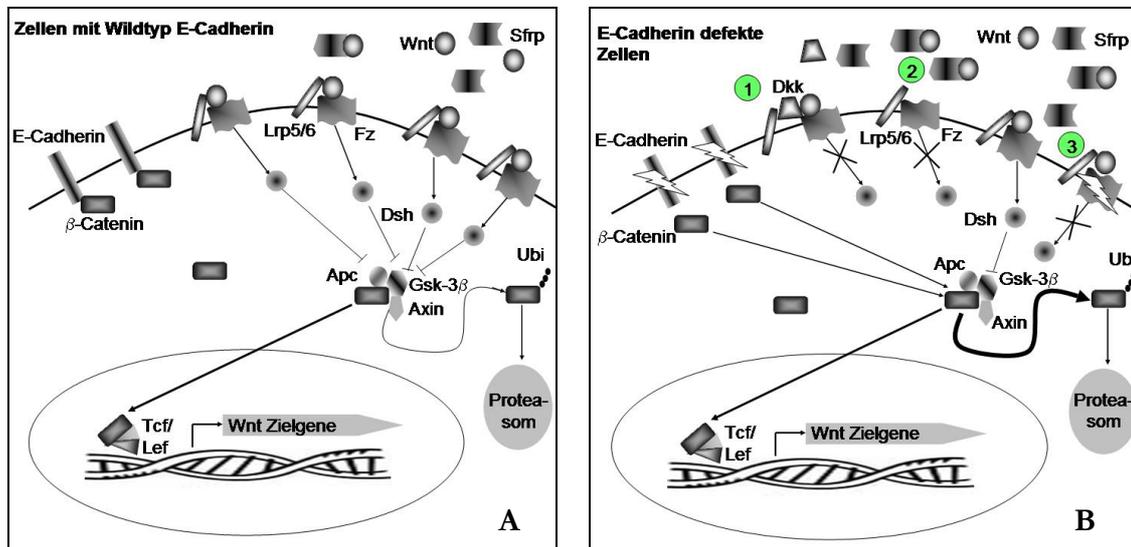


Abb. 58: Modell des WNT-Signalweg mit Wildtyp E-Cadherin oder ohne bzw. defektem E-Cadherin

**A:** Zellen mit Wildtyp E-Cadherin: An den intakten E-Cadherin Molekülen ist  $\beta$ -Catenin gebunden. Das WNT-Signal ist aktiv, Wnts binden an Lrp5/6-Fz, wodurch Dsh aktiviert wird. Dsh wiederum hemmt Gsk-3 $\beta$ , weswegen nur wenig  $\beta$ -Catenin phosphoryliert, ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut wird.

**B:** Die Zellen ohne oder mit defektem E-Cadherin haben mehr  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma, da E-Cadherin es nicht mehr an die Zellmembran binden kann. Gleichzeitig sind verschiedene WNT-Signalweg Repressoren differenziell exprimiert. 1: Dkk ist hochreguliert und bindet an Lrp5/6. Damit verhindert es die Bildung eines Lrp5/6-Fz-Wnt Komplexes und das WNT Signal kann nicht in die Zelle weitergeleitet werden. 2: Sfrp1 und Sfrp3 sind ebenfalls hochregulierte Inhibitoren des WNT Signalwegs. Sie binden außerhalb der Zelle an Wnts und verhindern so das Binden an Fz. 3: Fz selbst ist bei allen Zelllinien herabreguliert und das WNT Signal kann nicht in die Zelle weitergeleitet werden. Alle diese drei Effekte bewirken, dass Dsh nicht aktiviert wird und damit mehr  $\beta$ -Catenin phosphoryliert, ubiquitiniert und dann abgebaut wird. Da aber aufgrund des fehlenden/defekten E-Cadherins mehr  $\beta$ -Catenin cytoplasmatisch vorhanden ist, gleichen sich die Effekte aus.

Mittels Mikroarray und Northern Blot Analysen wurde in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, dass CTNNAL1 in den Zelllinien D8, D370A, D9 und MDA hochreguliert ist (Tab. 4 und Tab. 5). Zusätzlich konnte mittels Mikroarray Analyse noch zusätzlich eine Hochregulation bei der Zelllinie D479A nachgewiesen werden. CTNNAL1 ist verwandt mit  $\alpha$ -Catenin und Vinculin und hat starke Sequenzhomologien zu diesen Genen. Merdek (Merdek et al., 2004) konnte zeigen, dass Ctnnal1 and  $\beta$ -Catenin miteinander binden können und die Expression von CCND1 durch die Bindung von Ctnnal1 an dessen Promoter gehemmt wird. Ctnnal1 blockiert aber nicht nur die Tcf/Lef Bindeseite des CCND1 Promoters, sondern inhibiert auch das durch Ras vermittelte Signal (Ras und  $\beta$ -Catenin wirken synergistisch auf die Expression von Cyclin D1). Die Genexpression von CCD1 kann also auch von Ctnnal1 beeinflusst sein. Eine differentielle Expression von CTNNAL1 bei unterschiedlichem E-Cadherin Status kann durch die Bindung von Ctnnal1 an  $\beta$ -Catenin erklärt werden. Fehlendes oder mutiertes E-Cadherin führt zu einer geringeren Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und damit zu weniger Ctnnal1 an der Zellmembran. Es kann somit sein, dass die Zelle den Mangel an Ctnnal1 an der Zellmembran detektiert und versucht durch eine erhöhte

Expression von CTNNAL1 diesen Mangel zu beheben. Auch könnte aufgrund der Sequenzhomologie zu  $\alpha$ -Catenin eine Wirkung des Ctnnal1 von E-Cadherin über  $\beta$ -Catenin auf das Zytoskelett möglich sein, so dass eine erhöhte Ctnnal1-Expression der Versuch einer Wiederherstellung des Zell-zu-Zellkontaktes sein könnte.

## 2.2 Der Einfluss der Zelldichte auf den WNT Signalweg

Der Einfluss des Zell-zu-Zellkontakts auf den WNT-Signalweg wurde mittels eines in dieser Arbeit durchgeführten Dichteversuches untersucht (Kapitel D5). Unterschiedliche Zelldichten haben hierbei die Genexpression von DKK1, DSH, FZD2, SFRP1 und TLE2 beeinflusst. Bis auf das Gen SFRP1 sind alle diese Gene bei einer geringen Zelldichte heraufreguliert. Eine der am stärksten heraufregulierten Gene ist sowohl bei 25% als auch bei 50% Zelldichte bei beiden untersuchten Zelllinien (WT und D9) DKK1 (Tab. 10). DKK1 war ebenfalls bei einigen der acht untersuchten Zelllinien mit E-Cadherin Defekten heraufreguliert (Tab. 9). Die Ursache dieser erhöhten Genexpression könnte durch die geringe Zelldichte verursachten stark verringerter Zell-zu-Zellkontakt sein, wodurch E-Cadherin keinen homophilen Kontakt zu anderen E-Cadherin Molekülen mehr hat, sich  $\beta$ -Catenin somit vom E-Cadherin lösen und verstärkt im Cytoplasma und Zellkern vorkommen würde (Conacci-Sorrell et al., 2003). Um dem entgegenzuwirken, kommt es bei einer geringen Zelldichte ähnlich wie bei den Zelllinien ohne oder mit mutiertem E-Cadherin (Tab. 9) zu einer Heraufregulation von DKK1, dessen Genprodukt den WNT-Signalweg hemmt und somit autoregulativ den  $\beta$ -Catenin Abbau fördert. Dkk1 kann zudem die Zellproliferation hemmen und durch die Hemmung des WNT Signalwegs für die Aufrechterhaltung des Gewebes sorgen (Kuhnert et al., 2004). Dkk1 könnte also auch der bei den geringeren Zelldichten erhöhten Proliferation entgegenwirken. Das zweitstärkste dichteabhängige, heraufregulierte und im WNT-Signalweg involvierte Gen ist TLE2 (Tab. 12). Tle2 bindet an Tcf/Lef und inhibiert dessen Transkriptionsaktivität (Brantjes et al., 2001). Es ist somit ebenso wie Dkk1 ein Inhibitor des WNT-Signalwegs und verhindert die Transkription der Tcf/Lef regulierten Gene.

Widersprüchlich hingegen ist die ebenfalls in dieser Arbeit gefundene dichteabhängige Heraufregulierung von DSH. Dsh gibt das WNT-Signal von Fz an den Komplex aus Apc, Axin und Gsk-3 $\beta$  weiter, indem es den Komplex inhibiert und dadurch weniger  $\beta$ -Catenin abgebaut wird. Die Heraufregulation von Dsh führt also zu einer stärkeren Hemmung des Komplexes, wodurch weniger  $\beta$ -Catenin abgebaut wird (Uematsu et al., 2003). Ähnlich widersprüchlich ist die dichteabhängige Herabregulation von SFRP1. Durch die Herabregulation der Genexpression von Sfrp1 wird weniger Wnt gebunden und gehemmt, wodurch der WNT-Signalweg stärker aktiviert wird. Hingegen ist SFRP1 bei den Zelllinien mit mutierten/ohne E-Cadherin heraufreguliert. Passend hierzu ist das Gen des WNT-Rezeptor Fzd2 bei niedriger Zelldichte heraufreguliert. Das heißt, weniger Wnts werden durch Sfrp1 „abgefangen“, und gleichzeitig haben die Wnts mehr Rezeptormoleküle, an denen sie binden können.

Insgesamt wurden mittels der Mikroarray Analysen fünf dichteregulierte Gene des WNT-Signalwegs identifiziert. Während die differentielle Expression von DKK1 und TLE2 den WNT-Signalweg inhibiert, wirkt die differentielle Expression von DSH, SFRP1 und FZD2 fördernd auf den Signalweg. Von den Tcf/Lef transkribierten Genen sind CCND1, CD44 und PLAUR bei geringer Zelldichte heraufreguliert. Die anderen zehn ebenfalls auf dem Mikroarray befindlichen Tcf/Lef transkribierten Gene zeigen hingegen keine dichteabhängige differentielle Expression. Baba (Baba et al., 2003) konnte zeigen, dass CCND1 bei niedriger Zelldichte stärker exprimiert ist als bei hoher Zelldichte, und dass für die niedrigere Expression von CCND1 bei hoher Zelldichte das Gen VHL verantwortlich

ist. Ebenfalls ist in der Literatur beschrieben worden, dass CD44 bei niedriger Zelldichte stärker exprimiert ist als bei hoher Zelldichte (Leir et al., 2000). Leir et al. konnten ausschließen, dass die Heraufregulation von CD44 seine Ursache in unterschiedlicher Proliferationsraten der Zellen hat. Sie fanden eine Heraufregulation von CD44 bei Wunden, bei denen die Zellen einen Verlust des Zell-zu-Zellkontaktes und somit eine geringere Zelldichte haben. Im Gegensatz hierzu konnte Cooper (Cooper et al., 1998) zeigen, dass CD44 bei proliferierenden Zellen unabhängig von der Zelldichte heraufreguliert ist. Die Überexpression von CD44 bei den in dieser Arbeit durchgeführten Dichteversuchen kann somit sowohl aufgrund einer höheren Proliferationsrate als auch aufgrund der geringeren Zelldichte verursacht worden sein. Zusammengefasst zeigen bei unterschiedlicher Zelldichte einige im WNT-Signalweg involvierte Gene eine differentielle Genexpression, die aber im Bezug auf den WNT-Signalweg widersprüchlich ist. Die differentielle Expression von SFRP1, FZD2 und DSH fördert die Aktivität des WNT-Signalwegs, während die Genexpressionsveränderungen von DKK und TLE2 den WNT-Signalweg hemmen. Auch die Genexpressionswerte der WNT-Signalweg Zielgene sind in sich widersprüchlich. Eine geringe Zelldichte führt zur Heraufregulation der Tcf/Lef regulierten Gene CD44, PLAUR und CCND1, aber nicht zu einer Herabregulation der anderen zehn Tcf/Lef regulierten Gene. Alle diese Daten deuten nicht auf eine Involvierung des WNT-Signalwegs bei unterschiedlichen Zelldichten hin.

### **3. Die Matrix Metalloproteinasen 1, 3 und 9 werden von E-Cadherin beeinflusst**

Die hier durchgeführten Genexpressionsstudien mittels Mikroarray und Validierung durch Northern Blot und quantitative realtime RT PCR konnten zeigen, dass MMP3 bei allen nicht adhäsiven Zelllinien inklusive der MDA Zelllinie im Vergleich zur WT Zelllinie heraufreguliert ist (Tab. 4, Tab. 5 und Tab. 6). Auch die Proteinexpression von Mmp3 war passend zu den Genexpressionsdaten bei den nicht adhäsiven Zelllinien heraufreguliert (Abb. 43 und Abb. 45). Ein Vergleich der MMP3 Expressionen in E-Cadherin negativen bronchialen BZR Tumorzelllinien mit WT E-Cadherin transfizierten bronchialen BZR Tumorzelllinien wurde bei Nawrocki-Raby (Nawrocki-Raby et al., 2003) beschrieben. Sie konnten mittels Boyden Kammer und in vivo Versuchen zeigen, dass die untransfizierten Zellen invasiver sind und eine stärkere Expression von MMP1, MMP3, MMP9 und MT1-MMP nachweisen. Dies stimmt mit den hier gezeigten Daten für die Gene MMP1 und MMP3 überein, die bei der untransfizierten MDA Zelllinie im Vergleich zur WT Zelllinie ebenfalls heraufreguliert gefunden wurden. MT1-MMP befand sich nicht auf dem Mikroarray und für MMP9 gab es widersprüchliche Ergebnisse zwischen linearer und nichtlinearer Normalisierung der Signaldaten. Während MMP9 bei der nicht linearen Normalisierung bei den untersuchten Zelllinien keine differentielle Expression zeigte, konnte mittels der linearen Normalisierung eine Überexpression bei sechs Zelllinien gefunden werden. MMP9 gehört damit zu den wenigen Genen, bei denen es zu größeren Diskrepanzen zwischen den beiden Normalisierungen kam. Um eine klare Aussage über MMP9 machen zu können, muss das Gen noch validiert werden. Die Genexpression der MMP Inhibitoren TIMP1 und TIMP2, waren in der hier vorliegenden Arbeit nicht differentiell und entsprechen ebenfalls den Ergebnissen von Nawrocki et al., die keine differentielle Expression dieser beiden Gene bei dem Vergleich untransfiziert versus Wildtyp E-Cadherin transfizierten Zellen finden konnten. Die Studie von Nawrocki et al. sowie die hier vorliegende Studie zeigen eine inverse Korrelation zwischen MMP1, MMP3 und MMP9 (MMP9 unter Verwendung der linearen Normalisierung)

und E-Cadherin Expression. Eine inverse Korrelation zwischen E-Cadherin und MMP9 Expression konnte auch bei pankreatischen Karzinomen (Kuniyasu et al., 1999) und bei Prostata Krebs (Kuniyasu et al., 2003) gezeigt werden. Wang (Wang et al., 2002b) konnte zeigen, dass Brustkrebsmetastasen mit einer verringerten Expression von E-Cadherin eine höhere Expression von MMP9 zeigten. Bei Lungenkarzinom Patienten korrelierte ein hohes MMP:CDH1 Verhältnis mit Rezidiven und einer geringen Überlebenszeit. Patienten mit einem niedrigen MMP:CDH1 Verhältnis zeigten keine Rezidive und hatten eine höhere Überlebenszeit als Patienten mit hohem MMP:CDH1 Verhältnis (Herbst et al., 2000). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Morell-Quadreny (Morell-Quadreny et al., 2003) bei Nierenzellkarzinomen. Sie konnten ein inverses Verhältnis von MMP1 und E-Cadherin feststellen, welches mit der Tumorgröße korreliert. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Wildtyp E-Cadherin die Expression von MMPs verringert und die Tumorprogression inhibiert. Umgekehrt kommt es bei fehlendem E-Cadherin zu einer Heraufregulierung von MMPs, was sowohl die Invasivität erhöht als auch mit schlechteren klinischen Prognosen korreliert. Diese Daten entsprechen auch den Ergebnissen des siRNA Versuches. Mittels siRNA wurde die E-Cadherin Genexpression supprimiert. Die reduzierte Genexpression von E-Cadherin führte zu einer stärkeren Genexpression von MMP3. Dieser Sachverhalt gilt nicht nur für **fehlendes** E-Cadherin, sondern auch für **defektes** E-Cadherin. Die in dieser Arbeit detektierten Expressionsdaten der Zelllinien D8, D370A, E273A und D257A, die defektes E-Cadherin exprimieren und keinen Zell-zu-Zellkontakt haben, zeigen dies deutlich. So ist MMP3 bei den nicht adhäsiven Zelllinien zwischen 48 und 169fach heraufreguliert. Hingegen konnten keine differentiellen Expressionen bei den Zelllinien, die noch Zell-zu-Zellkontakt haben, festgestellt werden. MMP1 zeigt bei den nicht adhäsiven Zelllinien D370A, E273A und D257A ähnliche Genexpressionsveränderungen wie MMP3. Bei der Zelllinie D8 gab es divergente Ergebnisse für MMP1 zwischen Northern Blot und quantitativer realtime RT PCR (Tab.5 und Tab. 6) und es kann somit keine klare Aussage über die MMP1 Expression für die Zelllinie D8 gemacht werden. Zusammengefasst lässt sich aussagen, dass der fehlende Zell-zu-Zellkontakt, der seine Ursache in fehlendem oder defektem E-Cadherin hat, zu einer Erhöhung von MMP1, MMP3 und eventuell MMP9 führt.

Auf diesen Ergebnissen basierend wurde auch der Einfluss des Zell-zu-Zellkontakts mittels unterschiedlicher Zelldichten untersucht (Kap. D5). Die quantitativen realtime RT PCR Daten zeigten einen starken Einfluss der Zelldichte auf die Genexpression von MMP3 (Abb. 51 und Abb. 52). Es kam während der siebentägigen Kultivierungsdauer der Zelllinien WT, D370A und MDA bei zunehmender Zelldichte zu einer Reduktion der MMP3 Expression um 96-99% (!). Diese Ergebnisse konnten durch den zweiten Dichteversuch mit 25%, 50% und 75% Zelldichte nach zwei Kultivierungstagen verifiziert werden. Der Vergleich der Genexpressionswerte bei 25% Zelldichte mit 75% Zelldichte zeigte ebenfalls eine Reduktion der MMP3 Expression (um 72-92%). Der Zell-zu-Zellkontakt hat also einen maßgeblichen Einfluss auf die Genexpression von MMP3. Da der Einfluss der unterschiedlichen Zelldichten auf MMP3 auch bei der Zelllinie MDA, die kein E-Cadherin exprimiert, vorhanden war, ist E-Cadherin bei der Detektion des Zell-zu-Zellkontakts, der die MMP3 Expression reguliert, nicht involviert. Bei 25% als auch bei 50% Zelldichte haben alle untersuchten Zelllinien wenige Zell-zu-Zellkontakte (Abb. 50) und auch die Genexpression von MMP3 und MMP1 verändert sich zwischen diesen beiden Zelldichten nur wenig. Erst bei 75% Zelldichte, bei der die Zellen untereinander Zell-zu-Zellkontakte haben, ändert sich die Genexpression dieser Gene rapide. Das Signal für einen vorhandenen oder fehlenden Zell-zu-Zellkontakt könnte über ein anderes Zelloberflächenmolekül detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Ursache der MMP3

Genexpressionsveränderung beim Vergleich der Zelllinien mit unterschiedlichem E-Cadherin Status zu den WT E-Cadherin Zellen nicht E-Cadherin an sich, sondern der durch E-Cadherin gestörte Zell-zu-Zellkontakt ist. Ähnlich wie bei MMP3 sehen die Genexpressionsdaten für MMP1 aus. Beim Dichteversuch mit 25%, 50% und 75% Zelldichte war eine Reduktion der MMP1 Expression um 39-65 % und bei der siebentägigen Kultivierungsperiode von 77-81 % detektierbar. Nur die nicht transfizierte MDA Zelllinie hatte während der siebentägigen Kultivierungsperiode keine differentielle Expression von MMP1, hingegen zeigte sie beim Dichteversuch mit 25%, 50% und 75% Dichte die stärkste Herabregulation von MMP1 aller untersuchten Zelllinien. Kultivierungseffekte wie pH-Wert oder sezernierte Faktoren, die sich über einen längeren Kultivierungszeitraum anhäufen, könnten die dichteabhängige Herabregulation von MMP1 während des siebentägigen Dichteversuchs inhibieren.

Somit führen ein gestörter Zell-zu-Zellkontakt über defektes oder fehlendes E-Cadherin sowie der fehlende Zell-zu-Zellkontakt aufgrund geringer Zelldichte zu einer höheren Expression von MMP1 und MMP3. Die Expression von MMP1 und MMP3 ist damit indirekt von E-Cadherin abhängig, da E-Cadherin den Zell-zu-Zellkontakt beeinflusst. Umgekehrt kann Mmp3 E-Cadherin an der Zelloberfläche schneiden und ein „lösliches E-Cadherin“ Fragment (80 kDa) ins Medium freisetzen (Davies et al., 2001; Llorens et al., 1998; Luo et al., 1999; Miyaki et al., 1995). Der noch vorhandene membrangebundene Teil des E-Cadherins wird anschließend proteolytisch abgebaut (Ito et al., 1999). Davies et al. konnte zeigen, dass das Schneiden des E-Cadherins bei Prostakarzinomzellen zu einer Zerstörung des Zell-zu-Zelladhäsionskomplexes führt, wodurch die Zellen invasiv werden. Aber auch das „lösliche E-Cadherin“ inhibiert die E-Cadherin Funktion in einen parakrinen Weg und inhibiert somit ebenfalls die E-Cadherin abhängige Zellaggregation (Noe et al., 2001). Für die hier gezeigten Genexpressionsversuche wurde 10 % Serum dem Zellkulturmedium zugegeben. Es ist bekannt, dass das im Serum enthaltene „General proteinase inhibitor alpha 2 macroglobulin“ Mmp Aktivitäten neutralisiert (Woessner, 1991). Es kann davon ausgegangen werden, dass das E-Cadherin in den hier gezeigten Versuchen durch das „General proteinase inhibitor alpha 2 macroglobulin“ nicht durch Mmp3 abgebaut wurde und dass die E-Cadherin Funktion nicht durch lösliches E-Cadherin herabgesetzt wurde. Umgekehrt aber wird aufgrund der Verringerung oder des Verlusts des Zell-zu-Zellkontakts über E-Cadherin oder über eine geringe Zelldichte MMP3 heraufreguliert. In vivo hätte die erhöhte Mmp3 Expression den Effekt, dass noch vorhandenes E-Cadherin abgespalten werden würde und die extrazelluläre Matrix um die Zelle abgebaut wird. Damit gewinnt die Zelle weiter an Invasivität.

## **4. Verringerter Zell-zu-Zellkontakt beeinflusst in der Metastasierung involvierte Gene**

### **4.1 E-Cadherin abhängige CYR61 Expression und dessen Einfluss auf Wundheilungsgene**

CYR61 ist wie MMP3 eines der am stärksten heraufregulierten Gene bei den nicht adhäsiven Zelllinien und ist ebenfalls bei den Zelllinien D479A und D590A heraufreguliert. Dies wurde sowohl mittels Mikroarray Analyse als auch quantitativer realtime RT PCR festgestellt (Tab. 4 und Tab. 6). Vor kurzem wurde in der Publikation von Xie (Xie et al., 2004) und Tong (Tong et al., 2004) eine Beteiligung von CYR61 an WNT Signalweg beschrieben. Bei Tong et al.

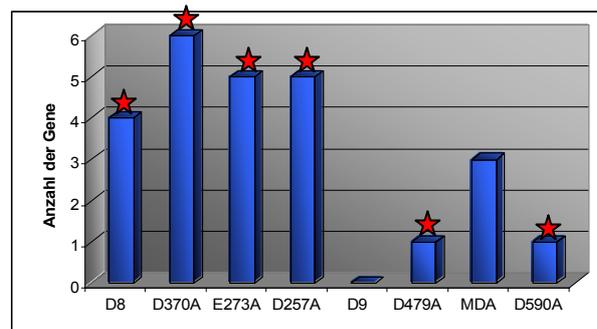
wurden in CYR61 transfizierten Lungenkrebszelllinien erhöhte Mengen des WNT-Signalweg Zielgens MYC und von  $\beta$ -Catenin gefunden, wobei  $\beta$ -Catenin sich in erster Linie im Zellkern befand. Xie *et al.* konnten zeigen, dass eine Cyr61 Überexpression zur Phosphorylierung von Gsk-3 $\beta$  führt, wodurch Gsk-3 $\beta$  inaktiviert wird. Es kommt hierdurch zu einer Akkumulierung von  $\beta$ -Catenin im Zellkern und der Bildung des Transkriptionsfaktor-Komplex  $\beta$ -Catenin/Tcf/Lef. Die Heraufregulierung von CYR61 in den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien müsste also zur Folge haben, dass es zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern kommt. Bei Luber *et al.* wurde aber für die hier verwendeten Zellen beschrieben, dass es zu keiner Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern kommt (Luber *et al.*, 2000). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit auch bei keiner der Zelllinien eine differentielle Expression von Tcf/Lef regulierten Genen nachgewiesen werden (mit Ausnahme der Zelllinie D8, siehe Kapitel E.4.4.2). Zusätzlich ist Cyr61 an der Zelladhäsion (über Integrin  $\alpha_6\beta_1$  zusammen mit Heparan Sulfate Proteoglykan) (Chen *et al.*, 2001a; Chen *et al.*, 2000), an der Zellmigration (über das Integrin  $\alpha_v\beta_5$ ) und an der Zellproliferation (über das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ ) (Grzeszkiewicz *et al.*, 2001) beteiligt. Die sechs Zelllinien, für die in der hier vorliegenden Arbeit eine erhöhte CYR61 Genexpression detektiert wurde, haben keinen oder einen geringeren Zell-zu-Zellkontakt und vier dieser Zelllinien haben zusätzlich eine erhöhte Motilität (Handschuh *et al.*, 1999; Handschuh *et al.*, 2001), was durch die erhöhte Genexpression von CYR61 verursacht sein könnte. Hingegen war keine Korrelation zwischen CYR61 und der Proliferationsrate der einzelnen Zelllinien erkennbar (Wachstumskurve Abb. 49).

Chen (Chen *et al.*, 2001a) haben des Weiteren gezeigt, dass Cyr61 in Fibroblasten die Expression von MMP1 und MMP3 induziert und sie konnten in einer weiteren Publikation zeigen (Chen *et al.*, 2001b), dass Cyr61 Protein in humanen Hautfibroblasten die Expression von Genen beeinflusst, die bei Angiogenese und Lymphogenese (VEGFA und VEGFC), bei Entzündungen (Interleukin 1 $\beta$ ), bei Veränderungen der extrazellulären Matrix (MMP1, MMP3, TIMP1,  $\mu$ PA und PAI-1) und bei Zell-Matrix Interaktion (COL1 $\alpha_1$ , COL1 $\alpha_2$ , Integrin  $\alpha_3$  und  $\alpha_5$ ) eine Rolle spielen. Interessanterweise sind viele dieser differentiell exprimierten Gene ebenfalls bei den hier untersuchten Zelllinien ohne Adhäsion (D8, D370A, E273A und D257A) in die gleiche Richtung differentiell exprimiert wie z.B. CYR61, MMP1, MMP3, TIMP3, VEGFC und ITGA3 (Mikroarray, Northern Blot und quantitative real-time RT PCR Daten (Abb. 59)). Nur die Gene PLAU, COL1A1 und COL1A2, die bei Chen *et al.* ebenfalls CYR61 reguliert waren, zeigten keine differentielle Genexpression. Bei der Zelllinie D9, die nur eine Restadhäsivität besitzt, ist CYR61 nicht heraufreguliert und passend zu der Theorie von Chen *et al.* ist keines der CYR61 regulierten Gene differentiell exprimiert (Abb. 59). Widersprüchlich sind aber die Genexpressionsdaten für die Zelllinien D479A, D590A und MDA. Bei D479A und D590A ist CYR61 heraufreguliert, aber keines der bei Chen *et al.* beschriebenen CYR61 regulierten Gene zeigte eine differentielle Expression (Abb. 59). Bei der Zelllinie MDA ist CYR61 nicht differentiell exprimiert, aber die bei Chen beschriebenen CYR61 regulierten Gene MMP3, ITGA3 und MMP1 sind differentiell heraufreguliert. Zusammengefasst lässt sich aussagen, dass die Expressionsdaten von fünf Zelllinien mit der These von Chen *et al.* korrelieren, aber drei Zelllinien abweichende Ergebnisse lieferten.

A

	D8	D370A	E273A	D257A	D9	D479A	MDA	D590A
CYR61	3,86	2,41	2,07	2,40	0,81	3,56	0,95	2,05
MMP3	16,44	3,20	3,26	2,27	0,99	1,06	8,22	1,02
ITGA3	2,77	1,63	1,96	2,00	0,91	0,82	1,44	0,76
VEGFC	10,07*	2,39	1,25	1,40	1,01	1,16	1,17*	0,92
MMP1	1,08	2,08	1,45	1,09	0,98	0,90	6,27	0,99
TIMP1	0,99	1,34	1,81	1,36	0,87	0,98	0,98	1,21
PLAU	0,97	0,95	1,09	1,05	0,92	0,94	0,94	1,04
COL1A2	0,96	1,01	0,94	0,95	0,91	1,04	1,00	1,00
COL1A1	1,13	0,87	1,00	1,02	0,89	1,11	1,00	0,98

## B



**Abb. 59: Expressionsveränderung der bei Chen beschriebenen CYR61 regulierten Gene**

In der Abb. **A** sind die Genexpressionsveränderungen der bei Chen *et al.* beschriebenen CYR61 regulierten Gene für alle in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien dargestellt. Grau markiert sind die Genexpressionen, die mit den Daten von Chen *et al.* übereinstimmen. Die Mikroarray Daten der ersten vier (nicht adhäsiven) Zelllinien, bei denen CYR61 und auch ein Großteil der CYR61 regulierten Gene differentiell exprimiert sind, stimmen mit denen von Chen *et al.* weitgehend überein sowie die Mikroarraydaten der Zelllinie D9, bei der weder CYR61 noch eines der der CYR61 regulierten Gene differentiell exprimiert ist. Hingegen sind die Expressionsdaten der Zelllinien D479A und D590A, bei denen CYR61 heraufreguliert, aber keines der bei Chen *et al.* beschriebenen CYR61 regulierten Gene differentiell exprimiert ist, ebenso diskrepant wie die Mikroarray Daten der Zelllinie MDA, bei der CYR61, aber keines der bei Chen *et al.* als CYR61 reguliert beschriebenen Gene differentiell exprimiert ist.

In der Abb. **B** ist die Anzahl der laut Chen *et al.* beschriebenen CYR61 regulierten Gene, die bei der jeweiligen Zelllinie differentiell exprimiert sind, dargestellt. Mit einem roten Stern sind die Zelllinien markiert, bei denen CYR61 heraufreguliert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Cyr61 Proteinexpression für alle Zelllinien bestimmt. Weder im Zellysat (Abb. 44) noch im Überstand (Abb. 45) konnte eine erhöhte Expression von Cyr61 detektiert werden. Im Gegensatz zu MMP3, bei dem Gen- und Proteinexpression korrelierten, sind die Genexpressionsdaten von CYR61 widersprüchlich zu den Proteinexpressionsergebnissen. Da das Cyr61 Protein nicht differentiell exprimiert ist, ist Cyr61 auch nicht für die in dieser Arbeit gefundenen differentiellen Genexpressionswerte der Abb. 59 verantwortlich.

Um festzustellen, ob Cyr61 überhaupt einen Effekt auf die hier untersuchten Zelllinien hat, wurden die Zelllinien WT und D370A mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cyr61 Protein inkubiert. Die laut Chen *et al.* CYR61 regulierten Genen ITGA3, CYR61 und MMP1 waren bei keiner der untersuchten Proteinkonzentrationen differentiell exprimiert (Abb. 46). Durch die Kokultivierung der beiden Zelllinien mit Cyr61 Protein konnten die Expressionsdaten von Chen *et al.* nicht nachvollzogen werden. Um einen Einfluss von Cyr61 auf die hier untersuchten Zelllinien gänzlich auszuschließen, wurde im Rahmen dieser Arbeit CYR61 durch den CYR61-52 siRNA Vektor bei den Zelllinien WT und D8 reprimiert. Dies führte zu einer Repression der CYR61 Genexpression um ca. 60%, aber zu keiner differentiellen Expression der Gene ITGA3, MMP3 und VEGFC (Abb. 48).

Alle diese Daten zeigen, dass Cyr61 bei den hier untersuchten Zelllinien keinen Effekt auf die Genexpression der bei Chen *et al.* beschriebenen Gene hat. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die MDA-MB-435S Zelllinie nicht den Rezeptor für Cyr61 exprimiert. Es ist bekannt, dass die MDA-MB-435S Zelllinie das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , über das Cyr61 die Zellproliferation beeinflusst, exprimiert (Chandrasekaran *et al.*, 1999; Grzeszkiewicz *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000). Das Integrin  $\alpha_v\beta_5$ , über das Cyr61 die Zellmigration beeinflusst, wird ebenfalls exprimiert (Bartsch *et al.*, 2003). Die Cyr61 stimulierten Expressionsveränderungen der bei Chen *et al.* beschriebenen Gene erfolgte durch die Bindung von Cyr61 an das Integrin  $\alpha_6\beta_1$  und das Heparan Sulfate Proteoglykan. Das Integrin  $\alpha_6\beta_1$  ist ebenfalls in der Zelllinie MDA-MB-435S exprimiert (Mukhopadhyay *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 1996; Wewer *et al.*, 1997), aber ob die Zelllinie auch Heparan Sulfate Proteoglykan exprimiert, ist hingegen nicht bekannt. Da sowohl das Integrin  $\alpha_6\beta_1$  als auch das Heparan Sulfate Proteoglykan für die Aktivierung

der Cyr61 regulierten Gene benötigt wird, kann spekuliert werden, ob das Fehlen eines Heparan Sulfate Proteoglykan die Ursache für den fehlenden Einfluss von Cyr61 auf die MDA-MB-435S Zelllinie verantwortlich ist. Auch wurden die Versuche von Chen *et al.* mit Hautfibroblasten durchgeführt. Es besteht die Möglichkeit, dass andere Zelltypen über einen anderen Cyr61 Regulationsmechanismus verfügen. Zusammengefasst lässt sich aussagen, dass die CYR61 Genexpression bei fehlender Adhäsion (sowohl durch fehlendes oder defektes E-Cadherin als auch durch geringe Zelldichte heraufreguliert ist (Ausnahmen davon sind die Zelllinien D479A und D590A, die trotz Zellkontakts eine erhöhte CYR61 Genexpression zeigten). Die von Chen *et al.* beschriebene regulatorische Funktion des Cyr61 konnte im Rahmen dieser Arbeit weder durch die Kokultivierung mit Cyr61 Protein noch mit der Reprimierung von CYR61 durch den CYR61 siRNA Vektor CYR61-52 nachvollzogen werden. Dennoch sind viele der bei Chen *et al.* beschriebenen Wundheilungsgene bei den vier Zelllinien mit gestörtem Zell-zu-Zellkontakt differentiell exprimiert.

## 4.2 Der Einfluss von E-Cadherin auf die Expression von Proliferations- und Angiogenesefaktoren

### 4.2.1 VEGFC

In der hier vorliegenden Studie zeigten die vier Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt eine Überexpression von VEGFC. Dies wurde mit Mikroarray Analysen als auch durch die Validierung mittels Northern Blot und quantitativer realtime RT PCR festgestellt (Tab. 4, Tab. 5 und Tab. 6). Die Western Blot Analyse zeigte bei den vier Zelllinien ohne Zellkontakt ebenfalls eine leichte Überexpression von Vegfc Protein. Vegfc gehört wie Cyr61 zu den angiogenetischen und lymphangiogenetischen Faktoren. Angiogenese und Lymphangiogenese sind bedeutende Faktoren bei dem Tumorwachstum. In mehreren Studien wurden die Zelllinie MDA-MB-435 und die Zelllinie MCF7 so modifiziert, dass sie Vegfc überexprimieren. Anschließend wurden sie in das Fettpolster der Brustdrüsen von Mäusen implantiert. Diese Zellen zeigten im Vergleich zu Zellen mit normaler Vegfc Expression eine erhöhte Tumorstreuungsrate, die ihre Ursache in der Induktion von peri- und/oder intratumoralen lymphatischen Gefäßen hat (Karpanen *et al.*, 2001; Mattila *et al.*, 2002; Skobe *et al.*, 2001). VEGFC mRNA und Protein war bei den hier untersuchten Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt überexprimiert. Dies könnte auch bei Zellen, die in vivo keinen Zellkontakt mehr untereinander haben, der Fall sein. Diese Hypothese steht im Einklang mit verschiedenen Studien, die eine Korrelation zwischen erhöhtem Vegfc Level und Lymphknotenmetastasen bei Schilddrüsen-, Prostata-, Magen-, Darm- und Lungenkarzinomen gefunden haben (in Metastasen haben die Zellen anfangs einen geringeren Zell-zu-Zellkontakt als im Gewebeverband) (Akagi *et al.*, 2000; Bunone *et al.*, 1999; Tsurusaki *et al.*, 1999; Yonemura *et al.*, 1999). Ein Tumor ist ab einem Durchmesser von 1 mm abhängig von einer Neovaskularisation, durch die der Tumor mit Nährstoffen versorgt wird und durch die er vom Zelltod durch Apoptose und Nekrose geschützt wird (Lau and Lam, 1999). Umgekehrt kann die Inhibierung der Angiogenese das Tumorwachstum limitieren und könnte somit auch für die Krebstherapie eingesetzt werden (Boehm *et al.*, 1997; Folkman, 1998). Auch in der Wundheilung, bei der Kapillaren von lymphatischen Gefäßen in das Wundgewebe hineinwachsen, spielt Vegfc eine wichtige Rolle (Paavonen *et al.*, 2000). Vegfc versorgt hierbei das Wundgewebe mit blut- und lymphatischen Gefäßen. Der Tumor nutzt also das ursprünglich in der Wundheilung stärker exprimierte Vegfc zu seiner eigenen Versorgung mit Nährstoffen. Es stellt sich die Frage, ob der Verlust des Zell-zu-Zellkontaktes oder das defekte E-Cadherin Molekül

der Auslöser der Überexpression dieser Gene ist. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Dichteveruche konnte der Einfluss des Zell-zu-Zellkontaktes unabhängig vom jeweiligen E-Cadherin Status untersucht werden (Abb. 51 und Abb. 52). Eine geringe Zelldichte führte bei beiden Dichteversuchen zu einer verstärkten Expression von VEGFC bei allen untersuchten Zelllinien. Da auch die E-Cadherin negative MDA Zelllinie bei geringerer Zelldichte eine erhöhte VEGFC Expression zeigte, ist diese Überexpression nicht E-Cadherin abhängig, sondern der fehlende Zell-zu-Zellkontakt ist der Auslöser hierfür. Dies ist insbesondere im zweiten Dichteveruch ersichtlich. Die Zellen hatten sowohl bei 25% als auch bei 50% Zelldichte wenig Zell-zu-Zellkontakt, hingegen waren bei 75% Zelldichte Zellkontakte vorhanden (Abb. 50). Der Expressionswert von VEGFC korreliert hierbei mit dem Zellkontaktstatus. Während zwischen 25% und 50% Zelldichte kein Effekt auf die Expression des Gens erkennbar war, nahm die Genexpression bei 75% Zelldichte in beiden Zelllinien ab. Dies ist z.B. bei der Wundheilung wichtig, wenn aufgrund einer Verletzung der Zell-zu-Zellkontakt verloren geht und die Bildung von Lymph- und Blutgefäße für die Regeneration des Gewebes induziert wird. Der gleiche Mechanismus kann den Tumor mit Nährstoffen versorgen und über die neu gebildeten Gefäße die Metastasierung fördern.

#### 4.2.2 SPARC

Das Protein Sparc (secreted protein acidic and rich in cysteine) ist ebenfalls bei der Angiogenese beteiligt und hat eine essentielle Rolle in der Wundheilung. SPARC ist bei den Zelllinien D370A, D257A, E273A, MDA, D479A und D590A heraufreguliert (nachgewiesen mittels Mikroarray, Northern Blot und quantitativer realtime RT PCR). Sparc ist ein extrazelluläres Glykoprotein, das in proliferierenden Zellen, bei der Organentwicklung und bei der Wiederherstellung von Gewebe, bei der Wundheilung, bei der Angiogenese und bei der Tumorgenese verstärkt exprimiert wird (Lane and Sage, 1994; Rempel *et al.*, 1999; Sage, 1997; Vial and Castellazzi, 2000). Es ist bekannt, dass Sparc die Zellform moduliert und die Zellproliferation reguliert (Lane and Sage, 1994; Sage, 1997), an der Zelladhäsion beteiligt ist (Ledda *et al.*, 1997; Rosenblatt *et al.*, 1997), sowie die Zellmigration (Hasselaar and Sage, 1992; Huynh *et al.*, 1999) und die Matrixkontraktion (Iruela-Arispe *et al.*, 1996) beeinflusst. Basu (Basu *et al.*, 2001) beschreibt, dass SPARC defiziente Mäuse eine signifikante Verzögerung in der Wundheilung haben. So konnten dermale Wildtyp-Fibroblasten eine Wunde in elf Stunden schließen, während SPARC defiziente dermale Fibroblasten auch nach 31 Stunden die Wunde noch nicht schließen konnten. Die Ursache hierfür ist eine unterschiedliche Motilität der Zellen. Sage (Sage *et al.*, 2003) konnte zeigen, dass Sparc durch Mmp3 prozessiert wird und die so entstandenen Peptide vaskuläres Wachstum sowie Migration fördern und Proliferation hemmen. SPARC ist, wie schon oben beschrieben, bei drei Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt und bei drei adhäsiven Zelllinien heraufreguliert. Da Sparc von Mmp3 geschnitten wird und die so entstandenen Peptide für die Migration und die Angiogenese verantwortlich sind, führt die erhöhte Mmp3 Proteinexpression bei den Zelllinien D8, D370A, E273A und D257A zu einer erhöhten Sparc-Aktivität. Bei den Zelllinien D370A, E273A und D257A ist sowohl eine erhöhte SPARC- als auch eine erhöhte MMP3 Expression nachweisbar. Beide Genexpressionsänderungen könnten synergistisch wirken, was bei diesen Zellen zu einer verstärkten Motilität und zur Angiogenese *in vivo* führen kann. Da es sowohl bei den adhäsiven als auch den nicht adhäsiven Zelllinien zu einer Heraufregulierung von SPARC kommt, scheint der Zell-zu-Zellkontakt keinen Einfluß zu haben. Dies steht im Einklang mit dem Dichteveruch, bei dem die Genexpression von SPARC ebenfalls nicht durch unterschiedliche Zelldichte beeinflusst wurde (Abb. 52). Dass eine erhöhte Sparc Expression auch in invasiven malignen Tumoren eine Rolle spielt, wurde in

verschiedenen Publikationen gezeigt (Golembieski et al., 1999; Ledda et al., 1997; Massi et al., 1999; Porter et al., 1995). Somit ist Sparc ebenfalls wie Vegfc und Cyr61 an Wundheilung und Tumorgenese beteiligt. Da in erster Linie das durch Mmp3 geschnittene Peptid für die oben gezeigten Effekte verantwortlich ist, könnten die Zellen D370A, E273A und D257A, die sowohl eine erhöhte SPARC- als auch MMP3 Expression zeigten, ein erhöhtes Invasionspotential haben.

### 4.2.3 PTN

Ein weiterer in dieser Arbeit differentiell exprimierter Angiogenesefaktor ist PTN (Pleiotrophin). Im Gegensatz zu den bisher diskutierten differentiell exprimierten Angiogenesefaktoren ist PTN herabreguliert. Bei PTN handelt es sich um das bei den Mikroarray Analysen und quantitativen realtime RT PCRs am stärksten herabregulierte Gen (Tab. 4 und Tab. 6). Ptn induziert bei Endothelzellen eine Gefäßbildung (Laaroubi et al., 1994) und ist dadurch für ein erhöhtes Metastasierungspotential bei Melanomen verantwortlich (Czubayko et al., 1994; Czubayko et al., 1996; Schulte et al., 1996). Auch in gastrointestinalen und pankreatischen Tumoren wird Ptn überexprimiert (Souttou et al., 1998). Ptn ist ebenfalls bei Wundheilung stark exprimiert, aber nur begrenzt auf den Bereich, in dem sich neue Blutgefäßbildung bilden (Yeh et al., 1998). Meng (Meng et al., 2000) konnte zeigen, dass Ptn ein Ligand der Rptp  $\beta/\zeta$  (Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatase  $\beta/\zeta$ ) ist und ein Komplex zusammen mit Rptp  $\beta/\zeta$  und  $\beta$ -Catenin bildet. Rptp  $\beta/\zeta$  dephosphoryliert tyrosinphosphoryliertes  $\beta$ -Catenin, und durch die Bindung von Ptn an Rptp  $\beta/\zeta$  wird dessen Dephosphorylierungsfunktion gehemmt. So konnten Meng et al. zeigen, dass die Tyrosin Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin bei Ptn behandelten Zellen stark zunimmt. Die Tyrosin Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin bewirkt, dass seine Affinität zu E-Cadherin abnimmt. Die Fähigkeit von Ptn, über die Hemmung von Rptp  $\beta/\zeta$  die Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zu fördern, führt somit zu einem Verlust der Komplexbildung  $\beta$ -Catenin/E-Cadherin. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Ergebnissen von Balsamo (Balsamo et al., 1996), der eine inverse Korrelation der Assoziation von E-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin und der  $\beta$ -Catenin Tyrosin Phosphorylierung beschrieb.

Die Genexpression von PTN ist bei allen acht in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien differentiell herabreguliert. Auch bei geringer Zelldichte wurde PTN stark herabreguliert gefunden und scheint somit sehr sensitiv durch den Zell-zu-Zellkontakt reguliert zu werden, wodurch sich auch geringe Zellkontaktverluste, wie z.B. bei der Zelllinie D590A, auf die PTN Genexpression auswirken. Im Gegensatz zu CYR61 und VEGFC ist PTN bei allen hier untersuchten Zelllinien aber nicht herauf-, sondern herabreguliert. Dies würde bedeuten, dass PTN Angiogenese und Proliferation in erster Linie bei den WT-Zellen fördert, nicht aber bei den Zelllinien mit gestörter E-Cadherin Funktion, was widersprüchlich ist zu den Genexpressionsdaten von CYR61 und VEGFC. Eine Erklärung, warum die beiden Angiogenesefaktoren VEGFC und CYR61 bei den Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt herauf-, PTN aber herabreguliert ist, liegt in der zusätzlichen Funktion von Ptn, über die Hemmung von Rptp  $\beta/\zeta$  die Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zu fördern. Die Tyrosinphosphorylierung führt zu einer Trennung des Komplexes  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin und damit zu einer Schwächung der Zelladhäsion. Da PTN bei allen hier untersuchten Zelllinien im Vergleich zur WT Zelllinie herabreguliert ist, wird weniger Rptp  $\beta/\zeta$  gehemmt, die Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin nimmt ab und damit erhöht sich die Assoziation von  $\beta$ -Catenin und E-

Cadherin, was letztendlich zu einem erhöhten Zell-zu-Zellkontakt führen würde. Dies ist aber aufgrund der mutierten oder fehlenden E-Cadherin Moleküle bei den hier verwendeten Zellen nicht möglich. Die Herabregulation von PTN ist somit der Versuch, das sich frei im Cytoplasma befindliche  $\beta$ -Catenin autokrin zu dephosphorylieren, damit es sich an E-Cadherin anlagern kann. Dies könnte somit, ähnlich wie schon oben in der Diskussion über den Einfluss von E-Cadherin auf den WNT Signalweg beschrieben, ein Versuch der Zelle sein, das sich frei im Cytoplasma befindliche  $\beta$ -Catenin auf einem konstanten Niveau zu halten. Durch das fehlende/mutierte E-Cadherin kommt es zu einer Erhöhung von cytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin, was die Zelle durch Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und damit wieder Bindung an die Zellmembran versucht zu kompensieren. Auch bei geringer Zelldichte ist PTN herabreguliert. Die geringe Expression von PTN ist der Versuch, den Zell-zu-Zellkontakt wieder herzustellen. Ein direkter Einfluss von Ptn über Rptp  $\beta/\zeta$  auf den WNT-Signalweg, wie er bei Deuel (Deuel *et al.*, 2002) diskutiert wird, ist aufgrund der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen des  $\beta$ -Catenin auszuschließen (Gsk-3 $\beta$  ist eine Ser/Thr Kinase, während Rptp  $\beta/\zeta$  eine Tyrosinphosphatase ist).

#### 4.2.4 MXI1

MXI1 ist bei allen Zelllinien mit Ausnahme der Zelllinie D9 und D370A herabreguliert. Es gehört zu der Gruppe der Mad Proteine und kann mit dem Protein Max Heterodimere bilden (Ayer *et al.*, 1993; Hurlin *et al.*, 1996; Zervos *et al.*, 1994). Mxi1-Max Heterodimere konkurrieren mit Myc-Max Heterodimeren um die selbe DNA Bindestelle und inhibieren damit indirekt Myc vermittelte Funktionen (Ayer *et al.*, 1993; Hurlin *et al.*, 1996). Es wird vermutet, dass durch die Herabregulation von Mxi1 die Myc Aktivität durch die Zunahme von transkriptionell aktiven Myc-Max Heterodimeren und der Abnahme der transkriptionell reprimierenden Max-Mad Heterodimere verstärkt wird (Prochownik *et al.*, 1998). Die sechs Zelllinien, bei denen MXI1 herabreguliert ist, könnten somit eine erhöhte Myc-Max Aktivität zeigen. Myc-Max aktiviert die Zellproliferationsgene Ornithin Decarboxylase und CDC25A und reprimiert das Wachstumsinhibierungsgen GAS1 (Lee *et al.*, 1997), was beides zu einer erhöhten Zellproliferation führt. Passend hierzu hatte die Zelllinie D370A, die die höchste Expression von MXI1 zeigte, das langsamste Zellwachstum, gefolgt von der Zelllinie D9, die die zweithöchsten Expression von MXI1 zeigte und das zweitlangsamste Zellwachstum hatte. Ebenfalls passend zu dieser Theorie hatten die am schnellsten wachsenden Zelllinien MDA und D8 eine niedrigere Expression von MXI1. Die Theorie, dass eine schwache Expression von Mxi1 zu einer stärkeren Aktivität von Myc über eine Zunahme von Myc-Max Komplexen und einer Abnahme von Max-Mad Komplexen führt und damit die Zellproliferation bei diesen Zelllinien erhöht, scheint sich für die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zu bestätigen.

#### 4.2.5 PRKCD

Das Tumorsuppressorgen PRKCD (Protein Kinase C $\delta$ ), das unter anderem die Zellproliferation inhibiert, wurde ebenfalls durch die Mikroarray Analysen bei den Zelllinien D370A, E273A, D257A, D9 und D479A als herabreguliert gefunden. Watanabe (Watanabe *et al.*, 1992) konnte einen negativen Effekt von Prkcd auf die Zellproliferation in CHO Zellen zeigen. Mischak (Mischak *et al.*, 1993) zeigte, dass eine erhöhte Prkcd Expression mit der Inhibierung der Proliferation bei NIH3T3 Mausfibroblasten korreliert und Kambhampati (Kambhampati *et*

*al.*, 2003) konnte einen antiproliferativen Effekt von endogenem *Prkcd* in MCF-7 Zellen zeigen. Der antiproliferative Effekt basiert auf der Inhibierung der Progression in die S-Phase (Ashton *et al.*, 1999; Harrington *et al.*, 1997). Da in dieser Arbeit die Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt eine herabregulierte Expression von PRKCD zeigten, und auch die Zelllinien D9 und D479A, die eine leicht verringerte Zelladhäsion haben, eine geringere PRKCD Expression zeigten, scheint der Zell-zu-Zellkontakt für die Herabregulation von PRKCD verantwortlich zu sein. Im Gegensatz zu dem Gen *MXI1* war aber keine Korrelation mit der Zellproliferation erkennbar. Die sich am schnellsten teilenden Zelllinien D8 und MDA hatten keine Herabregulation von PRKCD, hingegen zeigte die langsamer wachsenden Zelllinien D9 und D370A eine Herabregulation von PRKCD. Obwohl der Großteil der Literatur einen suppressiven Effekt von *Prkcd* auf die Proliferation beschrieben hat, gibt es auch einige Studien, die einen positiven Effekt von *Prkcd* auf die Zellproliferation gefunden haben. So konnte Kiley (Kiley *et al.*, 1999) zeigen, dass eine erhöhte Expression von *Prkcd* in metastatischen Zellen zu einem stärkeren zellkontaktunabhängigen Wachstum führt und dass dominant negatives *Prkcd* das zellkontaktunabhängige Wachstum blockieren kann. Ob *Prkcd* einen positiven oder negativen Einfluss auf die Zellproliferation hat, hängt vermutlich noch von weiteren Faktoren ab (z.B. IGF-I Rezeptor). Die Genexpressionsdaten dieser Arbeit korrelieren eher mit einem positiven Effekt von PRKCD auf die Zellproliferation.

#### 4.2.6 PRLR

Das PRLR Gen (Prolaktin Rezeptor), das ebenfalls einen proliferativen Einfluss hat, wurde mittels Mikroarray Analyse bei drei der Zell-zu-Zellkontakt defizienten Zelllinien (D370A, E273A und D257A) und den Zelllinien MDA und D590A mittels der Mikroarray Analysen als heraufreguliert gefunden (Tab. 4). Prlr dient als Rezeptor für Prl (Prolaktin). Das Binden von Prl an Prlr induziert eine Dimerisierung von Prlr und aktiviert dadurch unterschiedliche intrazelluläre Signalmoleküle wie JAK/STAT (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Auch führt Prl über Prlr zu einer erhöhten, gerichteten Motilität (Maus *et al.*, 1999). Dass Prl auch als mitogenes Zytokin agiert, zeigen Studien, die die Brustkrebszellproliferation durch Prl Antikörper oder Antagonisten partiell inhibieren konnten (Chen *et al.*, 1999; Ginsburg and Vonderhaar, 1995; Llovera *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Genexpression von PRLR in Tumoren höher ist als im direkt anschließenden „Normalgewebe“ (Clevenger *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 1997; Touraine *et al.*, 1998) und dass Prlr an der Angiogenese beteiligt ist (Struman *et al.*, 1999). Liby (Liby *et al.*, 2003) konnte anhand der auch in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie MDA-MB-435 zeigen, dass PRL transfizierte Zellen schneller proliferieren. Zwischen der PRLR Genexpression und dem Zellwachstum konnte in dieser Arbeit aber keine Korrelation festgestellt werden (Abb. 49). So hatte z.B. die Zelllinie D370A die höchste PRLR Genexpression, zeigte aber die geringste Wachstumsgeschwindigkeit und D8 hat nur eine leicht erhöhte PRLR Expression, wuchs aber von allen Zelllinien am schnellsten. Die Ursache für diese Diskrepanz ist die Kultivierung der Zellen in 10% FCS. FCS enthält u.a. laktogene Hormone wie Prl und plazentales Laktogen. Es ist beschrieben worden, dass das bovine Prl die humane Prl induzierte Proliferation inhibiert, da das bovine Prl an das humane Prlr bindet, aber bei dieser Bindung kein mitogenes Signal an die Zelle weitergegeben wird (Vonderhaar, 1998). Die Bindestelle Prlr ist damit blockiert. Dies wurde auch von der Studie von Liby *et al.* mit der Zelllinie MDA-MB-435 bestätigt. Hingegen könnte die erhöhte Expression von PRLR bei den Zelllinien D370A, E273A, D257A, MDA und D590A diesen Zellen *in vivo* eine erhöhte Proliferationsrate, Motilität und die Stimulierung von Angiogenese ermöglichen.

#### 4.2.7 STAT5a

Prlr, das Prl gebunden hat und dimerisiert ist, gibt sein Signal an Jak2 weiter, welches wiederum Stat5a tyrosinphosphoryliert (Ihle and Kerr, 1995; Parganas *et al.*, 1998). Das phosphorylierte Stat5a dissoziiert daraufhin von Prlr, dimerisiert und gelangt in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Bromberg and Darnell, 2000; Turkson and Jove, 2000). STAT5a wurde bei den hier durchgeführten Mikroarray Analysen bei den Zelllinien D370A, E273A und D590A heraufreguliert gefunden und, wie in den vorhergehenden Kapiteln diskutiert, ist auch die Genexpression von PRLR in diesen Zelllinien heraufreguliert. Sowohl aufgrund einer höheren Expression von STAT5a, als auch aufgrund einer erhöhten Expression von PRLR, die zu einer stärkeren Aktivierung von Stat5a führt, kommt es voraussichtlich bei den Zelllinien D370A, E273A und D590A zu einer stärkeren Expression der Stat5a abwärts gelegenen Gene wie DPAGT2 oder BCL-X<sub>L</sub> (gilt für Prlr nur bei Kulturbedingungen ohne FCS), die z.B. zu einer erhöhten Zellproliferation führen können.

#### 4.2.8 TIMP3

TIMP3 wurde durch die in dieser Arbeit durchgeführte quantitative realtime RT PCR bei den Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt und zusätzlich bei den Zelllinien D9, D479A und D590A als herabreguliert gefunden (Tab. 6). TIMP3 gehört zu der Familie der Matrix Metalloproteinasen Inhibitoren. Im Vergleich zu anderen Timps ist Timp3 mit der extrazellulären Matrix assoziiert (Leco *et al.*, 1994). Dadurch kann Timp3 räumlich begrenzt die Mmp Aktivität hemmen (Leco *et al.*, 1996). Timp3 ist auch ein effektiver Inhibitor von endothelialer Zellmigration und Angiogenese (Anand-Apte *et al.*, 1997; Qi *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2000). Es gibt viele Studien, die herausgefunden haben, dass eine Überexpression von TIMP3 zu einer Suppression von Tumorwachstum und Metastasen führt (Ahonen *et al.*, 2002; Bian *et al.*, 1996; Spurbeck *et al.*, 2002) und dass viele Tumorzelllinien eine reduzierte TIMP3 Expression zeigen (McElligott *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1995). Timp3 inhibiert auch alle Mmps, aber mit unterschiedlichen Affinitäten (Brew *et al.*, 2000). Somit inhibiert Timp3 auch Mmp1 und Mmp3. TIMP3 ist in dieser Arbeit in erster Linie bei den Zelllinien E273A, D257A und D8, bei denen MMP1 und/oder MMP3 heraufreguliert ist, herabreguliert und verstärkt somit durch eine verringerte Repression von Mmp1 und Mmp3 zusätzlich die extrazelluläre Matrixdegradierung. Diese inverse Regulation von MMP1, MMP3 und TIMP3 gilt aber nicht für alle Zelllinien. So ist TIMP3 bei der Zelllinie D9 herabreguliert, aber auch MMP1 und MMP3 sind herabreguliert. Zusätzlich zu seiner Funktion als Matrix Metalloproteinasen Inhibitor kann TIMP3 aber auch als Angiogenese Inhibitor fungieren. Eine inverse Regulation des Angiogeneseinhibitor TIMP3 zu den Angiogenese fördernden Faktoren VEGFC und CYR61 wurde im Rahmen dieser Arbeit bei den Zelllinien D8, D257A, E273A und D479A gefunden. Auch bei der Zelllinie D590A ist TIMP3 und CYR61 und bei den Zelllinien D370A und D9 TIMP3 und VEGFC invers reguliert. Diese inverse Regulation des Angiogeneseinhibitor TIMP3 und der beiden Angiogenesefaktoren VEGFC und CYR61 deutet auf ein verstärktes Angiogenesepotential bei diesen Zelllinien hin. PTN, das vierte an der Angiogenese beteiligt und differentiell exprimierte Gen, hat, wie schon oben beschrieben, neben einem Einfluss in der Angiogenese auch einen starken Einfluss auf die Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und ist vermutlich aufgrund seiner Dephosphorylierungsfunktion herab- statt heraufreguliert. Dennoch ist das Expressionsmuster von PTN dem von TIMP3 sehr ähnlich. Die Expressionsveränderungen stimmten bei sechs der acht Zelllinien überein. Nur die Zelllinien D370A und MDA unterschieden sich.

### 4.3 E-Cadherin abhängige Veränderung der extrazellulären Matrix

Charakteristisch für die Veränderungen der extrazellulären Matrix sind verringerte Zell-zu-Zellkontakte, eine erhöhte Sezernierung von Proteasen und eine erhöhte Zell-zu-Matrix Adhäsion. Wie schon oben diskutiert, spielt MMP1, MMP3 und TIMP3 sowohl in der Tumorgenese als auch in der Wundheilung eine wichtige Rolle. Bei der Wundheilung degradieren Mmp1 und Mmp3 Kollagen und extrazelluläre Matrixproteine, was den epidermalen Zellen ermöglicht zwischen der kollagenhaltigen Dermis und dem Grind zu wandern (Pilcher *et al.*, 1997). Bei der Tumorinvasion kommt es zur Proteolyse der extrazellulären Matrix und der Basalmembran. Die Degradation der extrazellulären Matrix führt des weiteren auch zur Bildung von Matrikinen, die ebenfalls zur Tumorinvasion beitragen und eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielen (Polette *et al.*, 2004). Auch können durch Mmps Zelladhäsionsmoleküle degradiert werden (wie z.B. E-Cadherin durch Mmp3), was zu einer erhöhten Invasivität dieser Zellen führt. Weitere Gene wie ITGA3, PLAUR, LRP und LASP1, die die extrazellulären Matrix verändern, bzw. von ihr beeinflusst werden und in dieser Arbeit differentiell exprimiert gefunden wurden, werden in diesem Kapitel diskutiert.

#### 4.3.1 ITGA3

Das Integrin Gen ITGA3 wurde bei den Zelllinien D8, D370A, MDA und D257A mittels Mikroarray, Northern Blot und quantitativer realtime RT PCR differentiell herauf- und bei der Zelllinie D590A differentiell herabreguliert gefunden (Tab. 4, Tab. 5 und Tab. 6). Es bildet zusammen mit Itgb1 einen Komplex, der Zell-zu-Matrix Interaktionen vermittelt. Der Hauptligand von Itga3/Itgb1 ist Laminin-5 (Carter *et al.*, 1991). Laminin-5 bewirkt über Itga3/Itgb1 eine Reorganisation des Zytoskeletts, die Bildung von Lamellipodien und Filopodien, eine erhöhte Invasivität (Fukushima *et al.*, 1998) und eine erhöhte Zellmigration (Tysnes *et al.*, 1996). Interessanterweise bildeten Itga3/Itgb1 defiziente duktale Epithelzellen statt eines subkortikalen Zytoskeletts Aktinfasern und hatten eine reduzierte Assoziation des E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Komplexes mit  $\alpha$ -Aktin (Wang *et al.*, 1999). In vivo sind der Itga3/Itgb1 Komplex und Cd151 in vielen Epithelzellen koexprimiert und interagieren miteinander (Sterk *et al.*, 2000; Sterk *et al.*, 2002). Diese Interaktion führt zu einer erhöhten Zellmotilität (Yang *et al.*, 2002a; Zhang *et al.*, 2001). Chattopadhyay (Chattopadhyay *et al.*, 2003) fand kürzlich heraus, dass der Itga3/Itgb1/Cd151 Komplex auch die Genexpression von PTP $\mu$  reguliert und für die Bildung eines Multimolekülkomplexes aus Pkc $\beta$ II, Rack1, Ptp $\mu$ ,  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin verantwortlich ist. Chattopadhyay *et al.* konnte des Weiteren zeigen, dass ITGA3 defiziente Zellen eine veränderte Zellmorphologie haben und keine Zellaggregation zeigen, was aber durch eine Transfektion mit ITGA3 aufgehoben werden kann. Die Aggregation der ITGA3 transfizierten Zellen konnte mit Hilfe eines E-Cadherin Antikörpers komplett inhibiert werden, nicht hingegen mit einem Antikörper gegen Itga3/Itgb1. Itga3/Itgb1 hat somit einen Effekt auf die E-Cadherin vermittelte Adhäsion, fungiert aber nicht selbst als Adhäsionsmolekül. Die Ursache hierfür liegt an der Verbindung des Zytoskeletts mit E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin über  $\alpha$ -Aktin.  $\alpha$ -Aktin war bei den Zell-zu-Zellkontaktstellen der ITGA3 transfizierten Zellen lokalisiert, hingegen bei den Zellen ohne den Itga3/Itgb1/Cd151-Komplex diffus über die Zelle verteilt.

Drei der hier untersuchten Zelllinien hatten ebenfalls diffus verteiltes Aktin (D8, D370A und D257A) (Handschuh *et al.*, 1999; Handschuh *et al.*, 2001). Interessanterweise zeigten diese drei Zelllinien eine Überexpression und keine

Herabregulation von ITGA3. Ebenfalls abweichend war die Herabregulation von ITGA3 bei der Zelllinie D590A, denn sie hatte wie die restlichen untersuchten Zelllinien einen zirkulären Aktgürtel und ausgeprägte Aktinfasern. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den zuvor zitierten Publikationen überein. Nur die Zelllinie MDA, die ITGA3 überexprimiert und ausgeprägte Aktinfasern hat, würde zu den oben gezeigten Literaturdaten passen. Eine Erklärung hierfür ist, dass die E-Cadherin Mutationen einen stärkeren Effekt auf das Cytoskelett hat als die Herauf- oder Herabregulation von ITGA3. Es ist ebenfalls beschrieben, dass das Fehlen des Itga3/Itgb1/Cd151 Komplexes auch zu einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an der  $\alpha$ -Aktin Bindestelle führt, was zwar keinen Einfluss auf die Assoziation von  $\beta$ -Catenin mit E-Cadherin hat, aber zu einer starken Reduktion der  $\alpha$ -Aktin Bindung an  $\beta$ -Catenin/E-Cadherin führte. Es wurde des Weiteren gezeigt, dass Ptp $\mu$  für die Dephosphorylierung des  $\beta$ -Catenin verantwortlich ist (Brady-Kalnay *et al.*, 1998; Brady-Kalnay *et al.*, 1995; Hellberg *et al.*, 2002). Ptp $\mu$  bewirkt bei gleichzeitiger Expression des Itga3/Itgb1/Cd151-Komplex eine Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und unterstützt damit die Zell-zu-Zelladhäsion. Eine mögliche Erklärung für die Heraufregulierung von ITGA3 in dieser Arbeit bei Zellen mit fehlendem oder in seiner Funktion gestörtem E-Cadherin ist, dass die Zellen autoregulatorisch versuchen, wieder den Zell-zu-Zellkontakt herzustellen. Durch die Heraufregulierung von ITGA3 könnten sich mehr Itga3/Itgb1/Cd151-Komplexe bilden, die dann Ptp $\mu$  aktivieren und so für eine stärkere Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin sorgen. Dies hätte den Effekt, dass das Cytoskelett sich wieder reorganisiert und es wieder zum Zell-zu-Zellkontakt kommt, was bei den hier verwendeten Zellen aber aufgrund der E-Cadherin Mutationen nicht möglich ist. Bei beiden Dichteversuchen ist die ITGA3 Genexpression bei geringer Zelldichte ebenfalls erhöht. Auch hier führt der fehlende Zell-zu-Zellkontakt zu einer Heraufregulierung von ITGA3; voraussichtlich mit dem gleichen Ziel, über Ptp $\mu$  wieder den Zell-zu-Zellkontakt herzustellen.

Der Hauptligand für den Itga3/Itgb1 Komplex ist Laminin-5 (Carter *et al.*, 1991). Das Lamininmolekül besteht aus drei Untereinheiten,  $\alpha$ 3,  $\beta$ 3 und  $\gamma$ 2 (Baker *et al.*, 1996), wobei der C-Terminus der  $\alpha$ 3-Untereinheit von Itga3/Itgb1 und Itga6/Itgb4 erkannt wird (Mizushima *et al.*, 1997). Die  $\alpha$ 3-Untereinheit liegt unprozessiert als 190 kDa Form vor, wird durch Plasmin geschnitten und in ein 160 kDa Fragment konvertiert. Die 190 kDa Form führt bei Epithelzellen zu einer erhöhten Motilität, während die 160 kDa Form für eine erhöhte Zellanhaftung verantwortlich ist (Goldfinger *et al.*, 1999). Die Ursache hierfür ist, dass die 160 kDa Form spezifisch von Itga6/Itgb4 und die 190 kDa Form von Itga3/Itgb1 erkannt wird und die beiden Komplexe eine entgegengesetzte Wirkung auf die Zelle haben. In gesundem Gewebe wird Laminin-5 durch Plasmin prozessiert und anschließend durch Itga6/Itgb4 erkannt, was der Zelle ein Signal zur Adhärenz gibt. Hingegen ist bei einer Wundverletzung die Produktion von Laminin-5 heraufreguliert und gleichzeitig die Prozessierung durch Plasmin herabreguliert. Dies führt dazu, dass sich am Wundrand in erster Linie unprozessiertes Laminin, im Inneren des Wundbettes dagegen prozessiertes Laminin befindet. Der Itga3/Itgb1 Komplex interagiert mit dem unprozessierten Laminin, was zur Zellmigration über das Wundbett führt. Im Inneren des Wundbettes befindet sich hingegen wieder mehr prozessiertes Laminin, was wieder zur Adhäsion über Itga6/Itgb4 führt (Goldfinger *et al.*, 1999). Beide Mechanismen führen letztendlich zum Schließen der Wunde. Die Heraufregulierung von ITGA3 bei den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien mit defektem E-Cadherin kann somit eine Erklärung für die erhöhte Motilität dieser Zelllinien sein. Das Fehlen der E-Cadherin Funktion führt zu einem Verlust der Zelladhäsion und die erhöhte Expression von ITGA3 führt zu einer erhöhten Motilität, wenngleich dies bisher nur in Bezug auf die Kultivierung mit Laminin untersucht wurde. Es ist

insbesondere bei Gehirntumoren bekannt, dass Gliomzelllinien über Laminin ins Gehirn eindringen und proliferieren (Knott *et al.*, 1998; Tysnes *et al.*, 1996). Die Gliomzellen erkennen hierbei Laminin durch Itga3/Itgb1. Dass eine erhöhte Expression von ITGA3 auch zu einer erhöhten Metastasenbildung im Gehirn führt, konnte vor kurzem Yoshimasu (Yoshimasu *et al.*, 2004) mit Lungenkrebszellen zeigen. Eine erhöhte Expression von ITGA3 wurde ebenfalls in metastatischen Läsionen und peritonealen Disseminationen bei Magen und Darmkrebs gefunden (Morini *et al.*, 2000; Prokopishyn *et al.*, 1999; Ura *et al.*, 1998). Das heraufregulierte ITGA3 kann somit bei den Zellen D8, D370A, MDA zu einer erhöhten Invasivität führen.

### 4.3.2 PLAUR

Eine physikalische Interaktion von Itga3/Itgb1 mit dem Oberflächenprotein Plaur (plasminogen activator, urokinase receptor) wurde bei Wei (Wei *et al.*, 1999) beschrieben. PLAUR ist interessanterweise ebenfalls wie ITGA3 bei den Zelllinien D8, D370A und D257A im Rahmen dieser Arbeit heraufreguliert gefunden worden. Plaur ist an der Zellmigration beteiligt (Blasi and Carmeliet, 2002; Ossowski and Aguirre-Ghiso, 2000) und im Gegensatz zu der Assoziation von Cd151 mit Itga3/Itgb1 ist die physikalische Interaktion von Itga3 mit Plaur nicht konstitutiv, sondern die Interaktion wird durch die Bindung von Plaur an Plaur erhöht (Wei *et al.*, 2001). Zhang (Zhang *et al.*, 2003) transfizierte in eine ITGA3 negative Nierenepithelzelllinie die ITGA3 und PLAUR Gene, was zu einer Dissoziation und einer erhöhten Motilität dieser Zellen führte. Diese Daten stehen im Widerspruch mit den oben gezeigten Daten von Chatopadhyay *et al.*, wo die Transfektion mit ITGA3 genau einen gegenteiligen Effekt hatte. Diese Ergebnisse stimmen aber mit den Daten dieser Arbeit überein. Die Zelllinien D370A und E273A, bei denen die Genexpression von PLAUR erhöht war, zeigten ebenfalls eine erhöhte Motilität und die Zelllinie D257A, die eine schwache Heraufregulation von PLAUR hatte, zeigte auch eine gering erhöhte Motilität. Zhang *et al.* konnte des Weiteren zeigen, dass die Ursache der Dissoziation der mit den ITGA3 und PLAUR Genen transfizierten Zellen fehlender Zell-zu-Zellkontakt aufgrund fehlender E-Cadherin Expression ist. Eine hohe Expression von PLAUR führte nahezu zu einem kompletten Verlust von E-Cadherin. Immunoblots konnten ebenfalls eine starke Reduktion von E-Cadherin, aber nicht von  $\beta$ -Catenin illustrieren. Zhang *et al.* untersuchten auch das Genexpressionsprofil der Zellen, die ITGA3 und PLAUR exprimieren, mit Zellen, die ITGA3 und kein PLAUR exprimieren. Es wurden hierbei u.a. Genexpressionsunterschiede von E-Cadherin (3fache Herabregulation), VEGFC (8fache Heraufregulation) und SNAI2 (15fache Heraufregulation) gefunden. Die Heraufregulation des E-Cadherin Repressors SNAI2 bewirkte die Herabregulation von E-Cadherin. Da E-Cadherin bei den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien transfiziert war und das Konstrukt über einen  $\beta$ -Aktin Promoter verfügt, hat SNAI2 keinen Effekt auf die E-Cadherin Expression in diesem System. Es ist aber interessant, dass PLAUR in dieser Arbeit bei drei Zelllinien, bei denen der Zell-zu-Zellkontakt verloren gegangen ist, heraufreguliert ist, nicht aber bei der E-Cadherin negativen Zelllinie MDA. Dies könnte ein Versuch der Zelle sein, die Expression des defekten E-Cadherin abzuschalten. SNAI2 ist hingegen bei allen hier untersuchten Zelllinien mit Ausnahme der Zelllinie D590A herab- und nicht heraufreguliert (siehe Kapitel E.4.8). Die E-Cadherin Mutationen zeigten somit in der hier vorliegenden Arbeit einen stärkeren Effekt als PLAUR auf die Expression von SNAI2. Hingegen ist die bei Zhang *et al.* beschriebene Herabregulation von VEGFC durch PLAUR ebenfalls bei den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien mit gestörtem Zellkontakt und der Zelllinie D479A detektiert worden (siehe Kapitel E.4.2.1). Defektes E-Cadherin

führt also in den hier untersuchten Zelllinien zu einer Heraufregulation von PLAUR. Plaur interagiert direkt mit Itga3, welches ebenfalls bei den Zelllinien mit defekten E-Cadherin heraufreguliert ist. Die Heraufregulierung beider Gene in den Zelllinien D370A, E273A und D257A kann die Ursache für eine stärkere Expression von VEGFC sein, das ebenfalls in diesen Zelllinien erhöht ist. Plaur spielt auch eine wichtige Rolle in der Wundheilung und Tumorgenese. Eine Überexpression von Plaur führt zu einer erhöhten Malignität bei Astrozytoma (Yamamoto *et al.*, 1994). Matrigel-Invasions Versuche zeigten, dass sowohl monoklonale Antikörper gegen Plaur (Mohanam *et al.*, 1993) als auch Antisense Transfektionen gegen PLAUR die Invasivität verringern (Mohanam *et al.*, 1997). Plaur ist somit ein wichtiges Signalmolekül für die Invasivität der Zelllinien, die keinen Zell-zu-Zellkontakt mehr haben.

#### 4.3.3 LRP

Im direkten Zusammenhang mit PLAUR wird auch das Gen LRP (low density lipoprotein receptor-related protein) in der Literatur beschrieben (Webb *et al.*, 2000). Die LRP Genexpression ist in der hier vorliegenden Studie bei allen nicht adhäsiven Zelllinien und zusätzlich bei der Zelllinie D590A herabreguliert. Parallel dazu konnte in dieser Arbeit eine Genexpressionserhöhung mittels Mikroarray Analysen von PLAUR bei drei der nicht adhäsiven Zelllinien (D8, D257A und E273A) nachgewiesen werden. Lrp bindet und internalisiert unterschiedliche Liganden wie z.B. Plau und Plaur und transportiert sie zur Degradierung zu den Lysosomen. Lrp spielt somit eine Rolle in der Antigen Präsentation, Phagozytose und Entfernung von apoptotischen Zellen (Gonias *et al.*, 2004). Webb (Webb *et al.*, 2000) konnte zeigen, dass die Reprimierung von LRP mittels Antisense RNA zu einer höheren Expression von Plau und Plaur und einer erhöhten Migration und Invasion der Zellen auf Matrigel führt. Die geringere LRP Expression führt hierbei zu einer verringerten Internalisierung von Plau und Plaur und damit zu einer verstärkten Expression beider Proteine auf der Zelloberfläche (Kounnas *et al.*, 1993). Bei den hier untersuchten Zelllinien kann die geringere Expression von LRP einen positiven Einfluss auf die Zelloberflächenexpression von Plaur und Plau aufgrund einer verringerten Internalisierung durch Lrp haben. So zeigten z.B. die Zelllinien D370A und E273A eine erhöhte Motilität und hatten sowohl eine erhöhte Genexpression von PLAUR als auch eine verringerte Genexpression von LRP. Zusammengefasst bewirkt die Herabregulation von Lrp1 eine geringere Internalisierung von Plau und Plaur und fördert somit ebenfalls die Invasivität der Zelllinien.

#### 4.3.4 LASP1

In Bezug auf die Zellmotilität spielt auch das Gen LASP1 eine essentielle Rolle. Funktionelle Analysen an Pseudopodien konnten zeigen, dass Lasp1 für die Zellmigration notwendig ist. LASP1 ist bei allen Zelllinien, die den Zell-zu-Zellkontakt verloren haben und zusätzlich noch bei den Zelllinien MDA und D479A im Rahmen dieser Arbeit heraufreguliert gefunden worden. Lin (Lin *et al.*, 2004) konnte zeigen, dass die Stimulierung von nicht motilen, ruhenden Zellen mit Wachstumsfaktoren oder extrazellulären Matrixproteinen zu einer Relokalisation von Lasp1 zu der Zellperipherie und den Pseudopodien führt, wo es mit der Bildung von fokalen Komplexen und der Aktinpolymerisation assoziiert ist. Der Abbau von Lasp1 Protein in den Zellen hingegen inhibiert die Zellmigration. Bei Handschuh *et al.* wurde beschrieben, dass die Zelllinien D8, D370A und E273A die höchste Motilität zeigen. Übereinstimmend dazu konnte in dieser Arbeit mittels der Mikroarrays gezeigt werden, dass diese Zelllinien auch die höchsten LASP1 Genexpressionen haben. Die Genexpressionsdaten von LASP zeigen auch bei den anderen in

dieser Arbeit untersuchten Zelllinien eine hohe Übereinstimmung mit den Motilitätsdaten von Handschuh *et al.* LASP hat somit vermutlich einen Einfluss auf die Motilität der hier untersuchten Zelllinien. Da die Daten aber keine 100 prozentige Korrelation zeigen (so ist bei der nicht motilen Zelllinie MDA LASP1 erhöht), spielen wohl noch weitere Faktoren für die Motilität eine Rolle. Eine Möglichkeit hierfür ist eine Phosphorylierung von Lasp1 durch cGK und cAK, was ebenfalls eine Rolle in der Zellmotilität und in der Organisation des Zellskeletts spielt (Butt *et al.*, 2003).

## 4.4 Weitere durch E-Cadherin in der Genexpression beeinflusste tumorrelevante Gene

### 4.4.1 MSH6

MSH6 ist ein DNA „Mismatch“ Reperaturgen, das Insertionen/Deletionen bis zu zwölf Basenpaaren erkennen und reparieren kann (Genschel *et al.*, 1998; Marsischky *et al.*, 1996). In der hier vorliegenden Studie ist MSH6 bei den vier Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt und zusätzlich bei der Zelllinie D590A herabreguliert (festgestellt mittels Mikroarray Analyse (Tab. 4)). Edelman (Edelman *et al.*, 1997) konnte zeigen, dass es durch Mutationen im MSH6 Gen zu einer Akkumulation von Frameshiftmutationen in sich wiederholenden Sequenzen kommt. Dies führt zu einer erhöhten Prädisposition für Krebs in Mäusen. Im erblichem kolorektalem Karzinom ohne Polyposis (HNPCC), das die häufigste erbliche Darmkrebsform beim Menschen ist, ist MSH6 häufig mutiert oder wird nicht exprimiert. MSH6 ist in der hier vorliegenden Studie in erster Linie bei den Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt herabreguliert. Ein Zusammenhang zwischen dem Msh6 Protein und E-Cadherin ist bisher noch nicht beschrieben worden. Die Expressionsdaten deuten aber darauf hin, dass der DNA Reperaturmechanismus bei verringertem oder verloren gegangenen Zell-zu-Zellkontakt herabreguliert wird, wodurch vermehrt Mutationen in diesen Zellen auftreten können. Es besteht auch die Möglichkeit, dass das Msh6 Protein noch weitere Funktionen neben der „Mismatch“ Reparatur besitzt. So wurde in einer Studie mit Hefe gefunden, dass Defekte in der MSH6-„Mismatch“ Reparatur zu Telomerase unabhängiger Proliferation führten (Rizki and Lundblad, 2001). Die Zellen mit reduzierter Expression könnten somit aufgrund der „Mismatch“ Reparaturdefekte eine erhöhte telomerische Rekombination und dadurch eine erhöhte Tumorgenität haben.

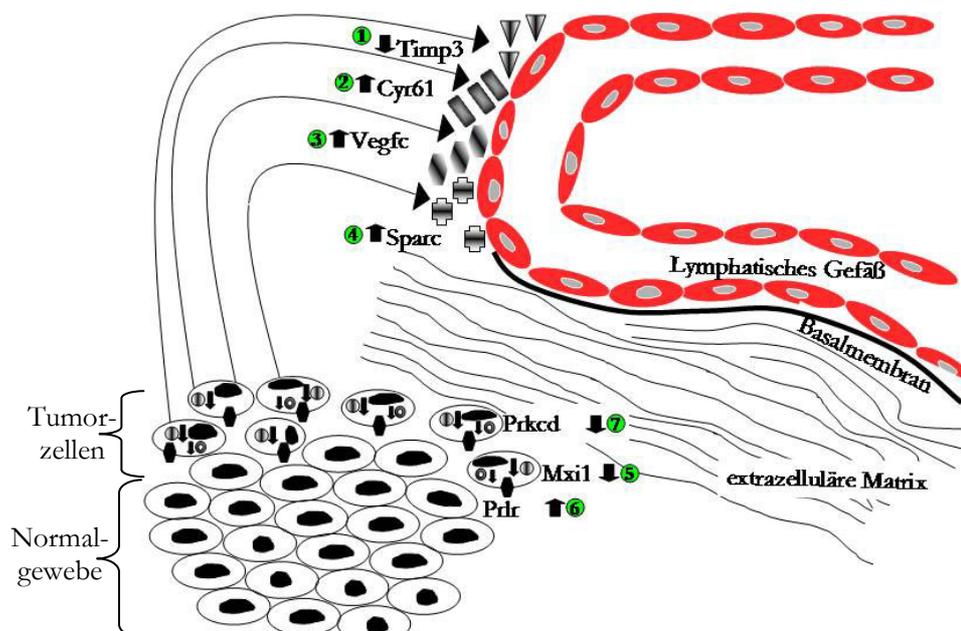
### 4.4.2 KAI-1

Auffällig ist die starke Heraufregulation der Genexpression von KAI-1 bei der Zelllinie D8. KAI-1 gehört zu der Familie der Tetraspanin Adhäsionsmoleküle und ist mit E-Cadherin an adhärenen Zellkontaktstellen kolokalisiert (Lee *et al.*, 2003b). Verschiedene Studien zeigen, dass die Expression von Kai-1 die Invasivität und Motilität erniedrigt (Takaoka *et al.*, 1998a; Takaoka *et al.*, 1998b). Anhand der auch in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie MDA-MB-435S konnte gezeigt werden, dass die Transfektion des Chromosoms 11, auf dem sich auch das Gen KAI-1 befindet (11p11.2), die Metastasierung der Zelllinie reprimiert (Phillips *et al.*, 1996). Auch die Transfektion des KAI-1 Gens in Brustkrebszelllinien führte zu einem verringerten Tumolvolumen und einer reduzierten Metastasierung. KAI-1 gehört, ebenso wie E-Cadherin, zu den Tumorsuppressorgenen und eine geringere Expression oder der Verlust korrelieren mit einer schlechten Prognose (Hinoda *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003a). Die

Heraufregulation von KAI-1 ist exemplarisch für eine ganze Reihe von Genen, die in der vorliegenden Arbeit nur bei der Zelllinie D8 differentiell exprimiert waren. Die Exon 8 Deletion scheint ein etwas anderes genetisches Programm zu aktivieren/inhibieren als die drei anderen E-Cadherin Mutationen, die ebenfalls für den Verlust der Zelladhäsion verantwortlich sind. Dies ist auch anhand des hierarchischen Cluster ersichtlich (Abb. 39). Um eine genauere Aussage treffen zu können, müsste z.B. eine Genexpressionsanalyse mit einem das gesamte Genom umfassenden Mikroarray durchgeführt werden.

#### 4.5 Zusammenfassung des Metastasierungsprozesses

Wie oben in der Diskussion gezeigt, ist ein Großteil der bei den vier Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt differentiell exprimierten Gene an der Metastasierung beteiligt. Die beiden Schemata (Abb. 60 und Abb. 61) zeigen, welche möglichen Auswirkungen die differentiell exprimierten Gene in vivo haben können. Beide Modelle basieren in erster Linie auf Genexpressions- und nicht auf Proteinexpressionsdaten.

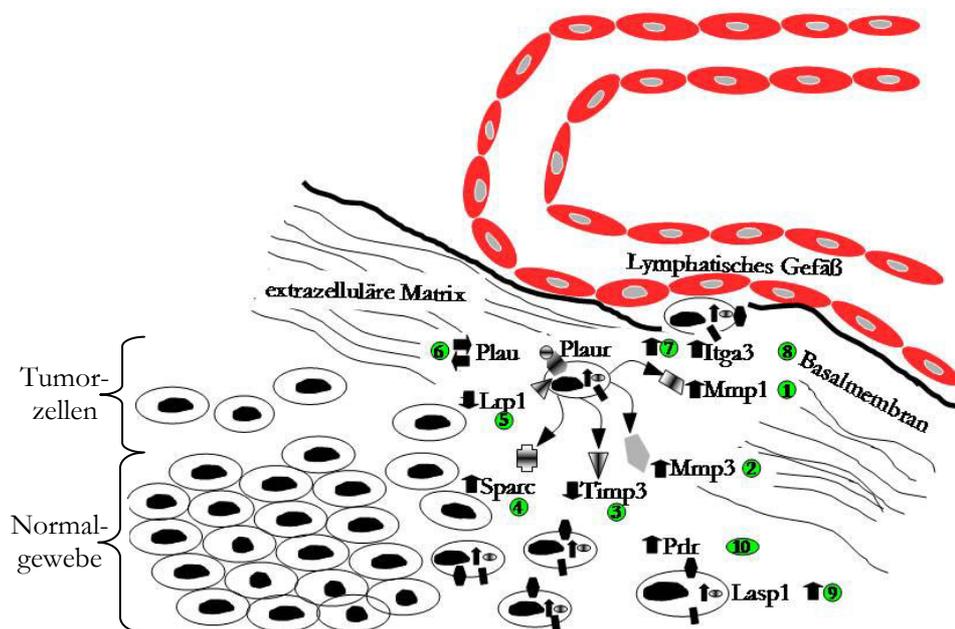


**Abb. 60: Schema für Angiogenese und Proliferation**

Das Schema zeigt die in dieser Arbeit gefundenen E-Cadherin abhängig differentiell exprimierten Gene, die an der Angio- und Lymphangiogenese sowie an der Proliferation beteiligt sind, im Zusammenhang. Die Pfeile nach unten zeigen herabregulierte Gene, die Pfeile nach oben heraufregulierte Gene bei den Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt.

Unter den differentiell exprimierten Genen der Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt ist TIMP3. Timp3 ist ein Angiogeneseinhibitor und ist herabreguliert (1). Gleichzeitig sind die Angiogenese- und Lymphangiogenesefaktoren Cyr61, Vegfc und Sparc heraufreguliert (2, 3 und 4). Alle vier Faktoren fördern somit die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und ermöglichen den Tumorzellen, durch die neu gebildeten Blut- und Lymphgefäße zu metastasieren. Mxi1 (5), ist ein Proliferationsinhibitor, der durch seine Herabregulation die Proliferation fördert. Die Genexpression von MXI1 korreliert mit den Wachstumskurven der hier untersuchten Zelllinien. Der mitogene Zytokinrezeptor Prr (6) hat einen proliferativen Einfluss und ist heraufreguliert. Passend hierzu ist das Tumorsuppressorgen Prkcd (7), das die Zellproliferation inhibiert, herabreguliert. Zusammengefasst sind bei den E-

Cadherin defizienten Zelllinien Gene für Angiogenese und Proliferation heraufreguliert und Gene für Angiogeneseinhibitoren und antiproliferative Faktoren herabreguliert.



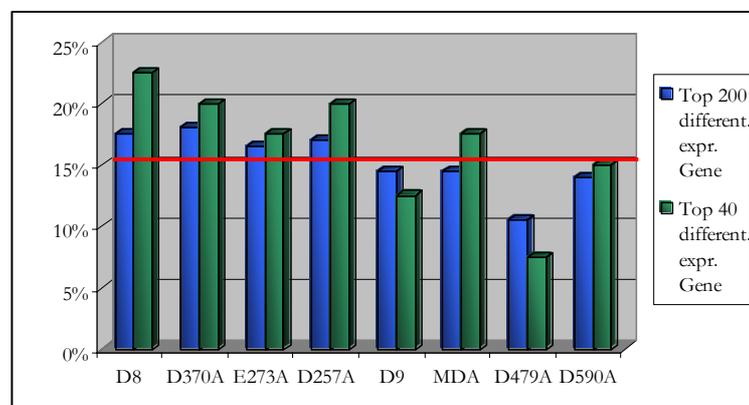
**Abb. 61: Schema für extrazelluläre Matrix Degradierung und Motilität**

Das Schema zeigt differentiell exprimierte Gene der extrazellulären Matrixdegradierung und das Durchdringen der Basalmembran. Die Pfeile nach unten zeigen herabregulierte Gene, die Pfeile nach oben heraufregulierte Gene und vertikale Pfeile nicht differentiell exprimierte Gene bei den Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt.

Während das Schema 60 die in dieser Arbeit differentiell gefundenen Gene im Bezug auf Angiogenese und Proliferation illustriert, zeigt das Schema 61 den Prozess der extrazellulären Matrix Degradierung und das Durchdringen der Basalmembran für die in dieser Arbeit differentiell exprimiert gefundenen Gene. Unter den am stärksten heraufregulierten Genen der Zellen ohne Zell-zu-Zellkontakt sind MMP1 (1) und MMP3 (2). Sowohl Mmp1 als auch Mmp3 degradieren die extrazelluläre Matrix. Neben der Heraufregulation von MMP1 und MMP3 ist TIMP3 (3), der Inhibitor von MMP1 und MMP3, herabreguliert. Dadurch ist die Aktivität von Mmp1 und Mmp3 noch zusätzlich erhöht. Mmp3 kann auch E-Cadherin an der Zelloberfläche schneiden und so ein „lösliches E-Cadherin“ Fragment (80 kDa) ins Medium freisetzen. Das Schneiden des E-Cadherins führt zu einer Zerstörung des Zell-zu-Zelladhäsionskomplexes, wodurch die Zellen invasiv werden können. Zusätzlich kann Mmp3 auch Sparc (4) schneiden und die so entstandenen Peptide fördern das vasculäre Wachstum sowie die Migration. SPARC ist, wie schon in Schema 60 gezeigt, ebenfalls heraufreguliert. Lrp1 (5) bindet und internalisiert viele unterschiedliche Liganden wie Plau (6) und Plaur (7) und transportiert sie zur Degradierung zu den Lysosomen. Die Reprimierung von LRP führt somit zu einem geringeren Abbau von Plau und Plaur und zusätzlich ist PLAUR heraufreguliert gefunden worden. Beide Effekte führen dazu, dass mehr Plaur auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wodurch die Zellen motiler und invasiver sind. Das Gen Integrin ITGA3 (8) ist heraufreguliert und interagiert mit Laminin-5, was zu einer Reorganisation des Zytoskeletts, der Bildung von Lamellipodien und Filopodien, einer erhöhten Invasivität und einer erhöhten Zellmigration führt. Das Gen LASP1 (9) und PRL (10), welche beide heraufreguliert sind, führen zu einer erhöhten, gerichteten Motilität. In der Summe bewirken die in dem Schema 61 differentiell exprimierten Gene einen Abbau der extrazellulären Matrix, eine erhöhte Zellmigration und Invasivität der Zellen.

#### 4.6 Einfluss von E-Cadherin auf Magenkarzinom relevante Gene

Zwei der vier E-Cadherin Mutationen (D8 und D370A), die zu einem Verlust des Zell-zu-Zellkontaktes in den MDA-MB-435S Zellen führen, konnten in Magenkarzinomen detektiert werden (Becker et al., 1994; Becker et al., 1993). Interessanterweise ist ein großer Teil der bei den Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt differentiell exprimierten Gene an der Entstehung von Magenkarzinomen beteiligt. So haben z.B. MMP3 (Abe et al., 2003), MMP1 (Mizutani et al., 2000), VEGFC (Yan et al., 2004), ITGA3 (Varis et al., 2002), SPARC (Wang et al., 2004), MXI1 (Wang et al., 2000), PRLR (Nagano et al., 1995) und PLAUR (Lee et al., 2004) einen Einfluss auf die Magenkarzinomentwicklung und –metastasierung. In der Abb. 62 ist der prozentuale Anteil der Gene, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Magenkarzinomentwicklung involviert sind (mindestens drei Publikationen in Zusammenhang mit Magenkarzinom (ermittelt durch das internetbasierende Literatursuchprogramm „Pubmatrix“)), für die 200 bzw. 40 am stärksten herauf- und herabregulierte Gene gezeigt. Im Durchschnitt waren 15% aller auf dem Mikroarray befindlichen Sonden relevant für Magenkarzinome. Der prozentuale Anteil der Magenkarzinom spezifischer Gene war bei den differentiell exprimierten Genen der vier Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt signifikant höher als die 15% aller Magenkarzinom spezifischer Gene auf den gesamten Mikroarray. Dies gilt insbesondere für die 40 am stärksten differentiell exprimierten Gene. Hingegen waren bei den vier Zelllinien mit Restadhäsivität unter den differentiell exprimierten Genen weniger Magenkrebs relevante Gene vorhanden (Abb. 62). Die E-Cadherin Mutationen, die den Zellkontakt stören, bewirken also eine verstärkte Herauf- bzw. Herabregulierung von Magenkrebs relevanten Genen. Bei dem Dichteversuch war hingegen keine Korrelation mit Magenkrebs relevanten Genen feststellbar (Daten nicht gezeigt), so dass die differentielle Expression vieler dieser Gene nur E-Cadherin, aber nicht Dichte abhängig sind.



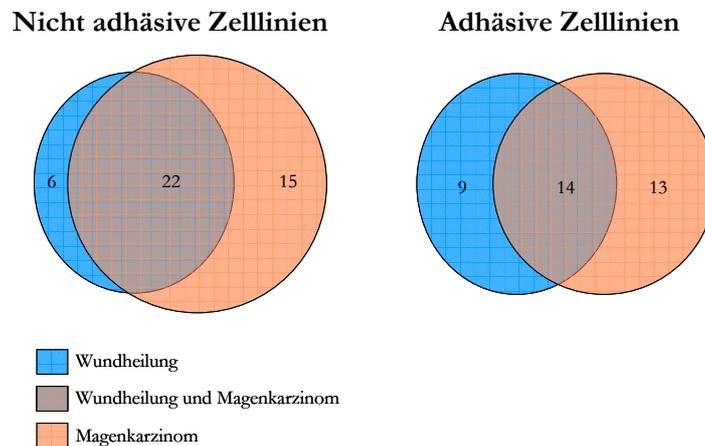
**Abb. 62: Magenkarzinom relevante Gene**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Magenkarzinom involvierten Genen bei den 40 und 200 am stärksten differentiell exprimierten Genen. Die rote Linie markiert den Anteil der Magenkrebs relevanten Gene des gesamten Mikroarrays.

#### 4.7 Einfluss von E-Cadherin auf Wundheilungs relevante Gene

Viele der in dieser Arbeit differentiell exprimierten Gene sind an der Wundheilung beteiligt. Bereits 1986 ist beschrieben worden, dass es histologische Übereinstimmungen zwischen der Tumormikroumgebung und der normalen Wundheilung gibt. Es wurde festgestellt, dass das Tumorstroma sich wie „aus den Rudern gelaufene Wundheilung“ verhält (Dvorak, 1986). Während der normalen Wundheilung kommt es aufgrund der Koagulation von Blut zu einer Signalkaskade, die Entzündungszellen anlockt, Fibroblasten und Epithelzellen zur Proliferation

stimuliert, zur Zellmigration führt und die Angiogenese induziert um die Gewebeintegrität wieder herzustellen. Viele dieser normalen Reparaturprozesse sind im Tumor und dessen Umgebung konstitutiv aktiv und essentiell für das Tumorstadium, die lokale Invasion und die Metastasierung zu entfernten Organen (Bissell and Radisky, 2001). Chronische Wunden und Entzündungsstadien sind bekannte Risikofaktoren für die Entstehung von Krebs. So gibt es z.B. eine Verbindung zwischen Zirrhose und Leberkrebs, Magengeschwür und Magenkrebs, Wundverbrennungen und schuppenartigem Hautkarzinom. Wie schon oben gezeigt spielen die Angiogenese, die Umformung der extrazellulären Matrix und die Zellmotilität sowohl in der Wundheilung als auch in der Metastasierung sehr wichtige Rollen. Viele der aufgrund der E-Cadherin Mutationen in dieser Arbeit differentiell exprimierten Gene spielen bei der Tumorgenese als auch in der Wundheilung eine Rolle. Die Größe der Schnittmenge zwischen wundheilungs- und Magenkarzinom relevanten Genen der jeweils 200 am stärksten differentiell herauf- und herabregulierten Gene ist in der Abb. 63 gezeigt. Bei den nicht adhäsiven Zelllinien ist der Anteil der Wundheilungs- und Magenkrebsgene größer als bei den adhäsiven Zelllinien, und es ist zu erkennen, dass fast alle Gene, die in der Wundheilung involviert sind, auch im Magenkrebs eine Rolle spielen. Dies ist hingegen nur in einem kleineren Umfang auch bei den adhäsiven Zellen der Fall, wobei die Schnittmenge deutlich kleiner ist als bei den nicht adhäsiven Zelllinien.



**Abb. 63: Gene, die bei der Wundheilung und/oder für Magenkrebs eine Rolle spielen.**

Die Abb. zeigt die Anzahl der Wundheilung bzw. Magenkrebs relevanter Gene bei den 100 am stärksten herauf- und herabregulierten Gene für die nicht adhäsiven und den adhäsiven Zelllinien. Die Gene, die ausschließlich an der Wundheilung beteiligt sind, sind türkis, die Gene, die ausschließlich für Magenkrebs relevant sind, sind in orange und die Gene, die sowohl für Wundheilung als auch für Magenkrebs eine Rolle spielen, sind in „türkis-orange“ dargestellt.

Dies spiegelt die „Doppelrolle“ dieser Gene wieder. Nach einer Verletzung werden temporär viele der normalen, differenzierten Zellcharakteristika abgeschaltet und Wundheilungsgene „angeschaltet“. Sowohl bei der Wundheilung als auch bei Krebs sind Zellen, die sich unter Normalbedingungen selten teilen, induziert, sich häufig zu teilen. Die Zellen dringen in die extrazelluläre Matrix und das Bindegewebe ein, epitheliale und Bindegewebszellen migrieren und neue Blutgefäße werden gebildet. Chang (Chang et al., 2004) konnte mittels Mikroarray Analysen zeigen, dass sich die Genexpressionsprofile von Tumoren und der Wundheilung sehr ähneln. Dies gilt auch für viele der schon vorher in dieser Arbeit beschriebenen Gene der Metastasierung. So ist z.B. eine Beteiligung von CYR61 (Latinkic et al., 2001), VEGFC (Ji et al., 2004), SPARC (Kyriakides and Bornstein, 2003), PLAUR (Dano et al., 1999), MMP1 (Gu et al., 2002) und MMP3 (O'Leary et al., 2002) nicht nur in der Metastasierung, sondern auch in der Wundheilung bekannt. Der Tumor nutzt also den natürlichen genetisch programmierten Mechanismus der Wundheilung um zu proliferieren und metastasieren. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, werden aufgrund von

E-Cadherin Mutationen, die zu einem Verlust des Zellkontaktes führen, viele dieser Gene differentiell exprimiert. Somit hat E-Cadherin einen direkten Einfluss auf die Genexpression der wund- und krebsrelevanten Gene.

## 4.8 Einfluss von Zell-zu-Zellkontakt auf E-Cadherin Repressoren und EMT

### 4.8.1 Einfluss von defektem E-Cadherin auf E-Cadherin Repressoren und EMT

Wie die quantitativen realtime RT PCR Expressionsdaten dieser Arbeit zeigen (Tab. 6), ist der Zell-zu-Zellkontakt wichtig in der Regulation der E-Cadherin Repressoren (SLUG, SNAIL, SIP, E12, ZEB1, TWIST). E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion spielt eine wichtige Rolle in der frühen Embryonalentwicklung, bei der viele phänotypische Veränderungen durch EMT (Epitheliale mesenchymale Transition) stattfinden. Charakteristisch für den neu gewonnenen fibroblastoiden Phänotyp ist der Verlust von E-Cadherin durch E-Cadherin Repressoren, was den Zellen erlaubt, sich vom Epithelgewebe zu trennen und frei zu migrieren. Die Aufrechterhaltung von stabilen Zell-zu-Zellkontakten und der Zellpolarität ist hingegen essentiell für die Funktionalität und Homeostasis von epithelialen Gewebe im erwachsenen Organismus. Diese strenge Gewebeorganisation geht während der Entwicklung von Karzinomen verloren und insbesondere im Invasionsstadium, wenn Tumorzellen vom Primärtumor dissoziieren, ist dieser Verlust nachweisbar. Eine stabile Expression des E-Cadherin Repressors Slug führt während der EMT zu einer vollkommenen Repression von E-Cadherin und dem Verlust des Zell-zu-Zellkontakts (Bolos *et al.*, 2003). In dem hier verwendeten Zellsystem haben die Zelllinien D8, D370A, E273A und D257A aber aufgrund eines nichtfunktionalen E-Cadherinmoleküls bereits ihren Zell-zu-Zellkontakt verloren. Im Gegensatz dazu haben die WT transfizierten Zellen einen engen Zell-zu-Zellkontakt (Handschuh *et al.*, 1999). Die WT Zelllinie hatte überraschenderweise eine signifikant höhere Menge an E-Cadherin Repressoren als die Zelllinie MDA, die kein E-Cadherin exprimiert. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten ihre Ursache im  $\beta$ -Aktin Promoter haben, durch den keine normale zelluläre Regulation von E-Cadherin möglich ist. Der Zell-zu-Zellkontakt der WT Zelllinie führt zu einer erhöhten Expression von E-Cadherin Repressoren. Diese Zellen versuchen den E-Cadherin abhängigen Zell-zu-Zellkontakt durch eine höhere Expression von E-Cadherin Repressoren zu verringern. Dies ist eine Gegenregulation um die Invasivität zu bewahren. Diese Hypothese wird durch die Expressionsdaten der Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt und der Zelllinien D9, D479A und D590A, die nur einen leichten Verlust des Zell-zu-Zellkontakts haben, unterstützt. Die Zelllinien ohne Zell-zu-Zellkontakt (D8, D370A, E273A und D257A) haben kein funktionelles E-Cadherin, simulieren somit einen niedrigen E-Cadherinstatus und exprimieren wenig E-Cadherin Repressoren. Ebenso sind die Expressionslevel der E-Cadherin Repressoren der MDA Zelllinie herabreguliert. Dies zeigt, dass diese Zellen den Zell-zu-Zellkontaktstatus erkennen und versuchen, den vorhandenen Zell-zu-Zellkontakt durch die Hochregulierung der E-Cadherin Repressoren zu reduzieren. Das Erkennen des Zell-zu-Zellkontaktes scheint sehr sensitiv zu sein, da auch die Zelllinien D9, D479A und D590A, die nur einen geringen Verlust des Zell-zu-Zellkontaktes haben, eine Herabregulation der E-Cadherin Repressoren zeigen, der aber etwas schwächer ist als bei den Zelllinien, die den Zell-zu-Zellkontakt verloren haben. Zusammengefasst haben die Transfektanten mit fehlendem oder mutiertem E-Cadherin eine geringe Menge an E-Cadherin Repressoren, da sie inaktives oder eingeschränkt funktionstüchtiges E-Cadherin besitzen und damit einen geringeren oder keinen Zell-zu-Zellkontakt haben, während die WT-Zelllinie durch eine hohe Expression der E-

Cadherin Repressoren versucht den Zell-zu-Zellkontakt zu verringern. Aber aufgrund des vor dem E-Cadherin befindlichen  $\beta$ -Aktin Promoters haben die E-Cadherin Repressoren keinen Effekt auf E-Cadherin.

#### 4.8.2 Einfluss der Zelldichte auf E-Cadherin Repressoren und EMT

Ein ähnlicher Effekt auf die Genexpression der E-Cadherin Repressoren konnte in dieser Arbeit durch unterschiedliche Zelldichten mittels quantitativer realtime RT PCR nachgewiesen werden (Abb. 54). Je höher die Zelldichte war und folglich je mehr Zell-zu-Zellkontakt die Zellen zueinander haben, umso höher war die Expression der E-Cadherin Repressoren. Der Einfluß der Zelldichte war besonders auf die Genexpression von SNAI, SIP1, Twist und ZEB1 ausgeprägt. Aber auch die Expression der Gene SNAIL und E12 waren dichteabhängig, wenngleich auch die Genexpressionsunterschiede geringer als bei den vier anderen E-Cadherin Repressoren ausfielen. Diese Daten korrelieren zu den zuvor gezeigten Genexpressionsdaten der acht Zelllinien mit unterschiedlichem E-Cadherin Status. Sobald die Zellen einen stärkeren Zell-zu-Zellkontakt haben, versuchen sie durch eine erhöhte Expression der E-Cadherin Repressoren ihre Invasivität wiederzuerlangen und den Zell-zu-Zellkontakt zu reduzieren. Dies ist aber, wie schon oben beschrieben, aufgrund des artifiziellen  $\beta$ -Aktin Promoters bei den hier untersuchten Zelllinien nicht möglich. Passend zu dieser Theorie ist auch, dass die Genexpression der E-Cadherin Repressoren bei der Zelllinie MDA, die von Natur aus kein E-Cadherin exprimiert, durch die Zelldichte weniger stark beeinflusst wird. Nur die Repressoren SNAI2 und SIP waren in der MDA Zelllinie bei hoher Dichte heraufreguliert, aber im Vergleich zu den drei anderen untersuchten Zelllinien fiel diese differentielle Expression deutlich geringer aus. Die Genexpression von SNAIL, TWIST, ZEB1 und E12 waren bei der MDA Zelllinie nicht von den unterschiedlichen Zelldichten beeinflusst. Da die MDA Zelllinie kein E-Cadherin exprimiert, versuchen diese Zellen bei zunehmender Zelldichte auch nicht die E-Cadherin Expression durch Repressoren zu verringern. Dies würde aber auch bedeuten, dass die mit den unterschiedlichen E-Cadherin Konstrukten transfizierten Zellen den Zell-zu-Zellkontakt Status über E-Cadherin detektieren und dann versuchen, den E-Cadherin vermittelten Kontakt durch eine Heraufregulation der E-Cadherin Repressoren zu reduzieren. Passend zu dieser Theorie hatten die WT Zelllinie die höchste Expression der E-Cadherin Repressoren und die Genexpressionsdaten des Dichteexperiments passt ebenfalls zu dieser Theorie. Die Zelllinie MDA hat zwar bei 75% Zelldichte ebenfalls einen stärkeren Zell-zu-Zellkontakt, aber aufgrund des fehlenden E-Cadherins hatte sie keine ausgeprägte Genexpressionserhöhung der E-Cadherin Repressoren. Zu dieser Theorie passen ebenfalls die prozentualen Zunahmen der E-Cadherin Repressoren im Zelldichteversuch bei den einzelnen Zelllinien. Sowohl die WT als auch die D9 Zelllinien zeigen adhäsive Eigenschaften, nicht aber die Zelllinie D370A (Handschuh *et al.*, 1999). Bei 25% Zelldichte haben alle drei Zelllinien keinen Zellkontakt zueinander (Abb. 50). Bei zunehmender Zelldichte ist der Zell-zu-Zellkontakt aufgrund des E-Cadherin Status bei den Zelllinien WT und D9 stärker ausgeprägt als bei der Zelllinie D370A und diese beiden Zelllinien hatten bei zunehmender Zelldichte auch eine stärkere Genexpressionszunahme der E-Cadherin Repressoren als die D370A Zelllinie.

Es gibt nur eine weitere Studie, die den Einfluss der Zelldichte auf die Genexpression von E-Cadherin Repressoren untersucht hat (Conacci-Sorrell *et al.*, 2003). Conacci-Sorrell *et al.* untersuchten die Genexpression von E-Cadherin, SNAIL und SNAI2 bei ebenfalls drei unterschiedlichen Zelldichten nach zwei Tagen Kultivierungsdauer. Es wurden in dieser Studie die Zelllinie SW480, die ein mutiertes APC und damit eine stabile  $\beta$ -Catenin Expression hat,

und die Zelllinien HCT116 und SW48, die  $\beta$ -Catenin mit einer stabilisierenden Mutation am  $\text{NH}_2$  Terminus besitzen, verwendet. Sie fanden auf den ersten Blick widersprüchliche Expressionswerte im Vergleich zu den in dieser Arbeit gefundenen Daten für das Gen *SNAI2*. Während bei Conacci-Sorrel *et al.* *SNAI1* bei den zunehmenden Zelldichten nicht differentiell exprimiert war, kam es zu einer Herabregulation von *SNAI2* und einer Heraufregulierung von E-Cadherin. Dieses scheinbar zu den hier gezeigten Daten widersprüchliche Ergebnis lässt sich aber durch den  $\beta$ -Catenin Status der bei Conacci-Sorrel *et al.* verwendeten Zellen und durch den Promoter der E-Cadherin Konstrukte bei den hier verwendeten Zellen erklären. Aufgrund der APC Mutation und der stabilisierenden Mutation am  $\text{NH}_2$ -Terminus des  $\beta$ -Catenins haben die bei Conacci-Sorrel *et al.* verwendeten Zelllinien einen deutlich höheren zellulären  $\beta$ -Catenin Gehalt als die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien. Conacci-Sorrel *et al.* konnte zeigen, dass die Zellen bei geringer Zelldichte aufgrund des fehlenden Zell-zu-Zellkontaktes weniger E-Cadherin auf der Zelloberfläche exprimieren, somit ist weniger  $\beta$ -Catenin an der Zelloberfläche gebunden und  $\beta$ -Catenin ist in erster Linie im Zellkern vorhanden. Die erhöhte  $\beta$ -Catenin Konzentration im Zellkern führt zu einer erhöhten Expression von Tcf/Lef regulierten Genen, und eines davon ist, wie Conacci-Sorrel *et al.* zeigen konnte, *SNAI2*. Dieses reduziert wiederum die Genexpression von E-Cadherin. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien haben die Zellen kein stabilisiertes  $\beta$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin kann, abhängig vom WNT-Signal, abgebaut werden. E-Cadherin wird bei diesen Zelllinien artifiziell mittels eines  $\beta$ -Aktin Promoters kontinuierlich transkribiert. E-Cadherin ist somit auch bei geringer Zelldichte an der Zelloberfläche exprimiert. Die Genexpressionsdaten für den WNT-Signalweg zeigten, wie schon vorher diskutiert, sich widersprechende Ergebnisse. Die differentielle Genexpression von SFRP1, FZD2 und DSH fördern die Aktivität des WNT-Signalwegs, während die Genexpressionsveränderungen von DKK und TLE2 den WNT-Signalweg hemmen. Eine geringe Zelldichte fördert zwar die Heraufregulation der Tcf/Lef regulierten Gene CD44, PLAUR und CCND1, aber ob dies über den WNT-Signalweg erfolgt ist unklar. Diese Daten deuten nicht darauf hin, dass es zu einer stärkeren Akkumulierung von  $\beta$ -Catenin im Zellkern kommt und es somit auch nicht zu einer stärkeren Genexpression von *SNAI2* kommt. Im Gegenteil, *SNAI2* wird bei den hier verwendeten Zelllinien bei zunehmender Zelldichte heraufreguliert um den Zell-zu-Zellkontakt wieder zu reduzieren. Da alle sechs E-Cadherin Repressoren bei hoher Zelldichte heraufreguliert sind, ist eine Involvierung von Tcf/Lef/ $\beta$ -Catenin auszuschließen, da nur *SNAI2* von Tcf/Lef transkribiert wird, aber nicht die anderen fünf E-Cadherin Repressoren.

#### 4.9 Zelldichte abhängige Veränderung der Genexpression

Ein ebenfalls durch die Zelldichte beeinflusstes Gen ist SRF (Serum Response Factor), das in dieser Arbeit durch Mikroarray Analysen bei niedriger Zelldichte heraufreguliert gefunden wurde. Srf vermittelt eine Induktion der früh exprimierten Gene während der  $G_0$ - $G_1$  Zell-Zyklus Transition. Srf bindet dabei an den Promoter dieser Gene. Es wird angenommen, dass Srf essentiell für die Progression des Zellzyklus ist, da eine Minderung der Srf Aktivität durch spezifische Antiseren oder antisens RNA die Zellproliferation hemmt (Chai *et al.*, 2004; Gauthier-Rouviere *et al.*, 1991; Soulez *et al.*, 1996). Da Srf essentiell für die Progression im Zellzyklus ist, ist die hier gefundene Heraufregulation bei geringer Zelldichte nicht überraschend, da Zellen in einer geringeren Zelldichte eine erhöhte Proliferationsrate haben als konfluenter ausgelegte Zellen. Poser (Poser *et al.*, 2000) konnten zeigen, dass die

CCND1 Transkription durch dominant negatives Srf geblockt wird. Die schon oben diskutierte Heraufregulation der CCND1 Genexpression könnte also ihre Ursache in der höheren Expression von SRF haben.

Mittels Mikroarray Analysen wurde auch das Tumorsuppressorgen p53 bei geringer Zelldichte heraufreguliert gefunden. Die Inaktivierung von p53 unterstützt die Krebsprogression (Bargonetti and Manfredi, 2002; Michael and Oren, 2002). Es ist von Bar (Bar *et al.*, 2004) gezeigt worden, dass die Zelldichte eine starke Auswirkung auf p53 in der Tumorsuppression und der zellulären Antwort auf eine Antikrebs Therapie hat. Bar *et al.* haben auch gezeigt, dass die p53 Aktivierung durch genotoxischen Stress bei hoher Zelldichte, nicht hingegen bei geringer Zelldichte supprimiert ist, da p53 in konfluent ausgelegten Zellen nicht effizient genug stabilisiert ist. Eine hohe Zelldichte entspricht eher der physiologischen Situation von Zellen in einem lebenden Organismus, in der die p53 Reaktion auf DNA-Schäden ebenfalls niedrig ist (Komarova *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1998). Bei einer geringen Zelldichte haben die Zellen nur minimale Cadherin vermittelte Zellkontakte, aber markante Integrin vermittelte fokale Adhäsionen. Integrin vermittelte Signalwege sind vermutlich für die Induktion von p53 nach einer DNA-Schädigung notwendig (Lewis *et al.*, 2002). Da p53 bei einer geringeren Zelldichte seine Aktivität stärker entfalten kann, hingegen bei hoher Zelldichte gehemmt ist, kann die höhere Genexpression von p53, die in dieser Arbeit bei geringer Zelldichte gefunden wurde, diesen Prozess weiter unterstützen. Sowohl bei 25% und 50% Zelldichte war p53 stärker exprimiert als bei 75% Zelldichte.

Ein bei niedriger Zelldichte durch Mikroarray Analyse gefundenes herabreguliertes Gen ist RAC1. Es ist beschrieben worden, dass die Mikroinjektion von mutiertem Rac1 in Keratinozyten den E-Cadherin abhängigen Zellkontakt stört (Braga *et al.*, 1997). Dies würde darauf hin deuten, dass Rac1 wichtig für den E-Cadherin abhängigen Zellkontakt ist. Auch Takaishi (Takaishi *et al.*, 1997) und Ehrlich (Ehrlich *et al.*, 2002) konnten zeigen, dass eine Aktivierung von Rac1 mit der Etablierung von E-Cadherin abhängiger Zelladhäsion korreliert. Eine Theorie hierfür ist, dass die Aktivität von Rac1 auf E-Cadherin vom Status des Zell-zu-Zellkontaktes abhängt (Pujuguet *et al.*, 2003). Dies wurde von Ehrlich *et al.* mittels GFP markiertem Rac1 bei geringer Zelldichte untersucht. Rac1 akkumuliert hierbei nur an den neu entstandenen Zell-zu-Zellkontakten und nicht an den schon bestehenden Zellkontakten. Die Ergebnisse von Pujuguet *et al.* deuten darauf hin, dass Rac1 den Transport von E-Cadherin zur Plasmamembran reguliert. In all diesen Publikationen wurde aber nur die Aktivität von Rac1, aber nicht dessen Genexpression, untersucht. In dem Zelldichteversuch dieser Arbeit haben sich bei 75% Zelldichte deutlich mehr Zell-zu-Zellkontakte gebildet als bei 25% oder 50% Zelldichte. Unter der Voraussetzung, dass eine höhere Genexpression von RAC1 auch mit einer höheren Gesamtaktivität korreliert, würde die bei 75% Zelldichte erhöhte Genexpression von RAC1 für die höhere Anzahl von neu gebildeten Zellkontakten benötigt, um den Transport von E-Cadherin an die Zellkontaktseiten zu regulieren. Dass aktiviertes Rac1 in der Regulation des Transports von Membranproteinen eine Rolle spielt, wurde auch in den Studien von Lamaze (Lamaze *et al.*, 1996), Jou (Jou *et al.*, 2000) und Akhtar (Akhtar and Hotchin, 2001) gezeigt.

## 5. Häufigkeit und Einfluss des -160 SNP im E-Cadherin Promoter

Im vorhergehenden Kapitel wurde der Einfluss von E-Cadherin auf die E-Cadherin Repressoren diskutiert. E-Cadherin Repressoren sind aber nicht die einzige Ursache einer Reprimierung der Genexpression von E-Cadherin. Li (Li *et al.*, 2000) entdeckten einen C/A Single Nukleotid Polymorphismus an der Stelle -160 im E-Cadherin

Promotor. Mittels transienter Transfektionsexperimente konnten sie zeigen, dass das A-Allel des Polymorphismus die transkriptionelle Effizienz im Vergleich zum C-Allel um 68% erniedrigt. Des Weiteren konnten sie mittels elektrophoretische „Mobility Shift“ und „Footprinting“ Experimente zeigen, dass transkriptionelle Faktoren besser an das C-Allel als an das A-Allel binden können. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieser Polymorphismus einen direkten Effekt auf die E-Cadherin Expression hat und ein potentieller genetischer Marker für ein erhöhtes Risiko für invasive/metastatische Krankheiten ist.

In dieser Arbeit wurde die Häufigkeit der C- und A-Allele dieses Polymorphismus in intestinalen und diffusen Magenkarzinomen bestimmt und, um eine größere Fallzahl zu erreichen, mit zwei ähnlichen Studien aus Portugal und Kanada kombiniert (Pharoah *et al.*, 2002). Insgesamt bestand die Studie aus 899 Testpersonen (433 Patienten und 466 Kontrollen). Es wurden hierbei keine signifikanten genotypischen Unterschiede zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe gefunden. Auch waren die Genotyp spezifischen Risiken nicht signifikant erhöht. Es konnte keine Korrelation im Bezug auf ein erhöhtes Risiko in der Gruppe der intestinalen- und diffusen histopathologischen Gruppen gefunden werden. Im Gegensatz zu diesen Daten hat eine kleine Studie von Wu (Wu *et al.*, 2002) ergeben, dass das A-Allel mit einem reduzierten Risiko von Magenkarzinom assoziiert ist. Dieses Ergebnis sollte aber mit Vorsicht interpretiert werden, da die Studie nur auf 201 Fällen und 196 Kontrollen basiert und darüber hinaus ist dieser Effekt auch widersprüchlich zu den Ergebnissen, die man aufgrund der Daten von Li *et al.* zu erwartet hätte. Hierbei ist beschrieben worden, dass das C- und nicht das A-Allel die Genexpression von E-Cadherin vermindert. Eine koreanische Studie von Park (Park *et al.*, 2003), die 146 Kontrollen und 292 koreanische Magenkrebspatienten untersuchte, fanden ebenfalls keine Korrelation zwischen dem -160 C/A Polymorphismus und dem Risiko an Magenkrebs zu erkranken. Die schwedische Studie von Jonsson (Jonsson *et al.*, 2004), in der dieser Polymorphismus in sporadischem, familiären und erblichen Prostatakarzinomen untersucht wurde, zeigte bei einer Gesamtzahl von 1036 Patienten und 669 Kontrollen ebenfalls keine signifikante Assoziation mit sporadischen oder familiären Prostatakrebs. Hingegen war das Risiko vom vererbten Prostatakarzinom sowohl bei den heterozygoten CA-Trägern als auch bei den homozygoten AA-Trägern erhöht. Ein ähnliches Ergebnis zeigte auch die Studie von Verhage (Verhage *et al.*, 2002), die 82 Prostatakarzinompatienten und 188 Kontrollen auf den Polymorphismus hin untersucht haben. Auch sie stellten fest, dass CA- oder AA-Träger ein erhöhtes Prostatarisiko haben. Zusammengefasst konnte weder in dieser Arbeit noch in den meisten durchgeführten weltweiten Studien ein Einfluss des Polymorphismus auf Magenkarzinomen gefunden werden. Hingegen ist ein erhöhtes Risiko an Prostatakrebs zu erkranken bei CA- oder AA-Trägern möglich.

# G Literaturverzeichnis

- (2001) Free and public expression. *Nature* 410, 851.
- Aach J., Rindone W. and Church G. M. (2000) Systematic management and analysis of yeast gene expression data. *Genome Res* 10, 431-45.
- Abe M., Yamashita S., Kuramoto T., Hirayama Y., Tsukamoto T., Ohta T., Tatematsu M., Ohki M., Takato T., Sugimura T. and Ushijima T. (2003) Global expression analysis of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat stomach carcinomas using oligonucleotide microarrays. *Carcinogenesis* 24, 861-7.
- Aberle H., Bauer A., Stappert J., Kispert A. and Kemler R. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* 16, 3797-804.
- Ahonen M., Ala-Aho R., Baker A. H., George S. J., Grenman R., Saarialho-Kere U. and Kahari V. M. (2002) Antitumor activity and bystander effect of adenovirally delivered tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Mol Ther* 5, 705-15.
- Ahrendt S. A., Halachmi S., Chow J. T., Wu L., Halachmi N., Yang S. C., Wehage S., Jen J. and Sidransky D. (1999) Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7382-7.
- Aird I., Bentall H. H. and Roberts J. A. (1953) A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups. *Br Med J* 1, 799-801.
- Akagi K., Ikeda Y., Miyazaki M., Abe T., Kinoshita J., Machara Y. and Sugimachi K. (2000) Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 83, 887-91.
- Akhtar N. and Hotchin N. A. (2001) RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 12, 847-62.
- Alizadeh A. A., Eisen M. B., Davis R. E., Ma C., Lossos I. S., Rosenwald A., Boldrick J. C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J. I., Yang L., Marti G. E., Moore T., Hudson J., Jr., Lu L., Lewis D. B., Tibshirani R., Sherlock G., Chan W. C., Greiner T. C., Weisenburger D. D., Armitage J. O., Warnke R., Levy R., Wilson W., Grever M. R., Byrd J. C., Botstein D., Brown P. O. and Staudt L. M. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-11.
- Anand-Apte B., Pepper M. S., Voest E., Montesano R., Olsen B., Murphy G., Apte S. S. and Zetter B. (1997) Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 817-23.
- Ashton A. W., Watanabe G., Albanese C., Harrington E. O., Ware J. A. and Pestell R. G. (1999) Protein kinase Cdelta inhibition of S-phase transition in capillary endothelial cells involves the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *J Biol Chem* 274, 20805-11.
- Augenlicht L. H., Wahrman M. Z., Halsey H., Anderson L., Taylor J. and Lipkin M. (1987) Expression of cloned sequences in biopsies of human colonic tissue and in colonic carcinoma cells induced to differentiate in vitro. *Cancer Res* 47, 6017-21.
- Ayer D. E., Kretzner L. and Eisenman R. N. (1993) Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-22.
- Baba M., Hirai S., Yamada-Okabe H., Hamada K., Tabuchi H., Kobayashi K., Kondo K., Yoshida M., Yamashita A., Kishida T., Nakaigawa N., Nagashima Y., Kubota Y., Yao M. and Ohno S. (2003) Loss of von Hippel-Lindau protein causes cell density dependent deregulation of CyclinD1 expression through hypoxia-inducible factor. *Oncogene* 22, 2728-38.
- Babic A. M., Kireeva M. L., Kolesnikova T. V. and Lau L. F. (1998) CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6355-60.
- Badiee A., Eiken H. G., Steen V. M. and Lovlie R. (2003) Evaluation of five different cDNA labeling methods for microarrays using spike controls. *BMC Biotechnol* 3, 23.
- Bafico A., Gazit A., Pramila T., Finch P. W., Yaniv A. and Aaronson S. A. (1999) Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem* 274, 16180-7.
- Bafico A., Liu G., Yaniv A., Gazit A. and Aaronson S. A. (2001) Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 3, 683-6.
- Baker S. E., Hopkinson S. B., Fitchmun M., Andreason G. L., Frasier F., Plopper G., Quaranta V. and Jones J. C. (1996) Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J Cell Sci* 109 (Pt 10), 2509-20.
- Balsamo J., Leung T., Ernst H., Zanin M. K., Hoffman S. and Lilien J. (1996) Regulated binding of PTP1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of beta-catenin. *J Cell Biol* 134, 801-13.
- Bar J., Cohen-Noyman E., Geiger B. and Oren M. (2004) Attenuation of the p53 response to DNA damage by high cell density. *Oncogene* 23, 2128-37.
- Bargonetti J. and Manfredi J. J. (2002) Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* 14, 86-91.
- Barrans J. D., Allen P. D., Stamatou D., Dzau V. J. and Liew C. C. (2002) Global gene expression profiling of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray. *Am J Pathol* 160, 2035-43.
- Bartsch J. E., Staren E. D. and Appert H. E. (2003) Adhesion and migration of extracellular matrix-stimulated breast cancer. *J Surg Res* 110, 287-94.
- Basu A., Kligman L. H., Samulewicz S. J. and Howe C. C. (2001) Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC Cell Biol* 2, 15.
- Battle E., Sancho E., Franci C., Dominguez D., Monfar M., Baulida J. and Garcia De Herreros A. (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-9.
- Baugh L. R., Hill A. A., Brown E. L. and Hunter C. P. (2001) Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* 29, E29.
- Bayani J., Brenton J. D., Macgregor P. F., Beheshti B., Albert M., Nallainathan D., Karaskova J., Rosen B., Murphy J., Laframboise S., Zanke B. and Squire J. A. (2002) Parallel analysis of sporadic primary ovarian carcinomas by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and expression microarrays. *Cancer Res* 62, 3466-76.
- Becker K. F., Atkinson M. J., Reich U., Becker I., Nekarda H., Siewert J. R. and Hofler H. (1994) E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 54, 3845-52.
- Becker K. F., Atkinson M. J., Reich U., Huang H. H., Nekarda H., Siewert J. R. and Hofler H. (1993) Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas. *Human Molecular Genetics* 2, 803-4.
- Becker N. and Korfmann A. (1998) *Der Onkologe*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Behrens J., Jerchow B. A., Wurtele M., Grimm J., Asbrand C., Wirtz R., Kuhl R., Wedlich D. and Birchmeier W. (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280, 596-9.
- Benes V. and Muckenthaler M. (2003) Standardization of protocols in cDNA microarray analysis. *Trends Biochem Sci* 28, 244-9.
- Berx G., Becker K. F., Hofler H. and van Roy F. (1998a) Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* 12, 226-37.
- Berx G., Becker K. F., Hofler H. and van Roy F. (1998b) Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Human Mutation* 12, 226-37.
- Berx G., Cleton-Jansen A. M., Nollet F., de Leeuw W. J., van de Vijver M., Cornelisse C. and van Roy F. (1995) E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *Embo J* 14, 6107-15.
- Bian J., Wang Y., Smith M. R., Kim H., Jacobs C., Jackman J., Kung H. F., Colburn N. H. and Sun Y. (1996) Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3. *Carcinogenesis* 17, 1805-11.
- Birchmeier W. and Behrens J. (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198, 11-26.
- Bissell M. J. and Radisky D. (2001) Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1, 46-54.

## Literaturverzeichnis

---

- Blanco M. J., Moreno-Bueno G., Sarrío D., Locascio A., Cano A., Palacios J. and Nieto M. A. (2002) Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21, 3241-6.
- Blasi F. and Carmeliet P. (2002) uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 932-43.
- Bobik A. and Tkachuk V. (2003) Metalloproteinases and plasminogen activators in vessel remodeling. *Curr Hypertens Rep* 5, 466-72.
- Boehm T., Folkman J., Browder T. and O'Reilly M. S. (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390, 404-7.
- Bole-Feysot C., Goffin V., Ederly M., Binart N. and Kelly P. A. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19, 225-68.
- Bolos V., Peinado H., Perez-Moreno M. A., Fraga M. F., Esteller M. and Cano A. (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 116, 499-511.
- Bowtell D. D. and Sambrook J. F. (2002a) *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Bowtell D. D. and Sambrook J. F. (2002b) *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, New York.
- Brabletz T., Jung A., Dag S., Hlubek F. and Kirchner T. (1999) beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155, 1033-8.
- Bradley R. S., Cowin P. and Brown A. M. (1993) Expression of Wnt-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and E-cadherin and increased cellular adhesion. *J Cell Biol* 123, 1857-65.
- Brady-Kalnay S. M., Mourtou T., Nixon J. P., Pietz G. E., Kinch M., Chen H., Brackenbury R., Rimm D. L., Del Vecchio R. L. and Tonks N. K. (1998) Dynamic interaction of PTPmu with multiple cadherins in vivo. *J Cell Biol* 141, 287-96.
- Brady-Kalnay S. M., Rimm D. L. and Tonks N. K. (1995) Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo. *J Cell Biol* 130, 977-86.
- Braga V. M., Machesky L. M., Hall A. and Hotchin N. A. (1997) The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* 137, 1421-31.
- Brantjes H., Roose J., van De Wetering M. and Clevers H. (2001) All Tcf/HMG box transcription factors interact with Groucho-related corepressors. *Nucleic Acids Res* 29, 1410-9.
- Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball C. A., Causton H. C., Gaasterland T., Glenisson P., Holstege F. C., Kim I. F., Markowitz V., Matese J. C., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J. and Vingron M. (2001) Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 29, 365-71.
- Brazma A., Robinson A., Cameron G. and Ashburner M. (2000) One-stop shop for microarray data. *Nature* 403, 699-700.
- Brew K., Dinakarandian D. and Nagase H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477, 267-83.
- Brigstock D. R. (2003) The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* 178, 169-75.
- Bromberg J. and Darnell J. E., Jr. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19, 2468-73.
- Brown E. J. (1995) Phagocytosis. *Bioessays* 17, 109-17.
- Bugge T. H., Kombrinck K. W., Flick M. J., Daugherty C. C., Danton M. J. and Degen J. L. (1996) Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell* 87, 709-19.
- Bunone G., Vigneri P., Mariani L., Buto S., Collini P., Pilotti S., Pierotti M. A. and Bongarzone I. (1999) Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol* 155, 1967-76.
- Bustin S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-93.
- Butt E., Gambaryan S., Gottfert N., Galler A., Marcus K. and Meyer H. E. (2003) Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146. *J Biol Chem* 278, 15601-7.
- Caca K., Kolligs F. T., Ji X., Hayes M., Qian J., Yahanda A., Rimm D. L., Costa J. and Fearon E. R. (1999) Beta- and gamma-catenin mutations, but not E-cadherin inactivation, underlie T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcriptional deregulation in gastric and pancreatic cancer. *Cell Growth Differ* 10, 369-76.
- Cadigan K. M. and Nusse R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11, 3286-305.
- Cano A., Perez-Moreno M. A., Rodrigo I., Locascio A., Blanco M. J., del Barrio M. G., Portillo F. and Nieto M. A. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.
- Carl T. F., Dufton C., Hanken J. and Klymkowsky M. W. (1999) Inhibition of neural crest migration in *Xenopus* using antisense slug RNA. *Dev Biol* 213, 101-15.
- Carter W. G., Ryan M. C. and Gahr P. J. (1991) Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes. *Cell* 65, 599-610.
- Carver E. A., Jiang R., Lan Y., Oram K. F. and Gridley T. (2001) The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21, 8184-8.
- Chai J., Jones M. K. and Tarnawski A. S. (2004) Serum response factor is a critical requirement for VEGF signaling in endothelial cells and VEGF-induced angiogenesis. *Faseb J* 18, 1264-6. Epub 2004 Jun 4.
- Chambers A. F. and Matrisian L. M. (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89, 1260-70.
- Chandrasekaran S., Guo N. H., Rodrigues R. G., Kaiser J. and Roberts D. D. (1999) Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. *J Biol Chem* 274, 11408-16.
- Chang C. and Werb Z. (2001) The many faces of metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11, S37-43.
- Chang H. Y., Sneddon J. B., Alizadeh A. A., Sood R., West R. B., Montgomery K., Chi J. T., Rijn Mv M., Botstein D. and Brown P. O. (2004) Gene Expression Signature of Fibroblast Serum Response Predicts Human Cancer Progression: Similarities between Tumors and Wounds. *PLoS Biol* 2, E7.
- Chattopadhyay N., Wang Z., Ashman L. K., Brady-Kalnay S. M. and Kreidberg J. A. (2003) alpha3beta1 integrin-CD151, a component of the cadherin-catenin complex, regulates PTPmu expression and cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 163, 1351-62.
- Chen C. C., Chen N. and Lau L. F. (2001a) The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 10443-52.
- Chen C. C., Mo F. E. and Lau L. F. (2001b) The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 47329-37.
- Chen N., Chen C. C. and Lau L. F. (2000) Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin alpha 6beta 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 275, 24953-61.
- Chen W. Y., Ramamoorthy P., Chen N., Sticca R. and Wagner T. E. (1999) A human prolactin antagonist, hPRL-G129R, inhibits breast cancer cell proliferation through induction of apoptosis. *Clin Cancer Res* 5, 3583-93.
- Cheng C. W., Wu P. E., Yu J. C., Huang C. S., Yue C. T., Wu C. W. and Shen C. Y. (2001) Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* 20, 3814-23.
- Clark R. A. (1990) Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. *J Invest Dermatol* 94, 128S-134S.
- Clark R. A., Ashcroft G. S., Spencer M. J., Larjava H. and Ferguson M. W. (1996a) Re-epithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from alpha v beta 5 to alpha v beta 6 integrins. *Br J Dermatol* 135, 46-51.

## Literaturverzeichnis

---

- Clark R. A., Lanigan J. M., DellaPelle P., Manseau E., Dvorak H. F. and Colvin R. B. (1982) Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 79, 264-9.
- Clark R. A., Nielsen L. D., Welch M. P. and McPherson J. M. (1995) Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. *J Cell Sci* 108 ( Pt 3), 1251-61.
- Clark R. A. F. (1996) The molecular and cellular biology of wound repair. *New York: Plenum Press*, 2nd.
- Clark R. A. F., Heldin C. H. and Westermark B. (1996b) *The molecular and cellular biology of wound repair*. Plenum Press, New York.
- Cleveland W. S. (1979) Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J. Amer. Statist. Assoc.* 74, 829-36.
- Cleveland W. S., E.-Grosse and Shyu W. M. (1992) Statistical Models in S.
- Clevenger C. V., Chang W. P., Ngo W., Pasha T. L., Montone K. T. and Tomaszewski J. E. (1995) Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma. Evidence for an autocrine/paracrine loop. *Am J Pathol* 146, 695-705.
- Colantuoni C., Henry G., Zeger S. and Pevsner J. (2002) Local mean normalization of microarray element signal intensities across an array surface: quality control and correction of spatially systematic artifacts. *Biotechniques* 32, 1316-20.
- Comijn J., Berx G., Vermassen P., Verschueren K., van Grunsten L., Bruyneel E., Mareel M., Huylebroeck D. and van Roy F. (2001) The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7, 1267-78.
- Conacci-Sorrell M., Simcha I., Ben-Yedidia T., Blechman J., Savagner P. and Ben-Ze'ev A. (2003) Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 163, 847-57.
- Cooper N. L., Bardy P., Bacani J., Kuusk U., Dougherty G. J., Eaves C. J. and Emerman J. T. (1998) Correlation of CD44 expression with proliferative activity of normal human breast epithelial cells in culture. *Breast Cancer Res Treat* 50, 143-53.
- Cui X. and Churchill G. A. (2003) Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol* 4, 210.
- Cunningham B. A., Leutzinger Y., Gallin W. J., Sorkin B. C. and Edelman G. M. (1984) Linear organization of the liver cell adhesion molecule L-CAM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5787-91.
- Curran S. and Murray G. I. (1999) Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 189, 300-8.
- Curran S. and Murray G. I. (2000) Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36, 1621-30.
- Czubayko F., Riegel A. T. and Wellstein A. (1994) Ribozyme-targeting elucidates a direct role of pleiotrophin in tumor growth. *J Biol Chem* 269, 21358-63.
- Czubayko F., Schulte A. M., Berchem G. J. and Wellstein A. (1996) Melanoma angiogenesis and metastasis modulated by ribozyme targeting of the secreted growth factor pleiotrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14753-8.
- Dale T. C. (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 329 ( Pt 2), 209-23.
- Damsky C. H., Richa J., Solter D., Knudsen K. and Buck C. A. (1983) Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* 34, 455-66.
- Dano K., Romer J., Nielsen B. S., Bjorn S., Pyke C., Rygaard J. and Lund L. R. (1999) Cancer invasion and tissue remodeling--cooperation of protease systems and cell types. *Apmis* 107, 120-7.
- Davies G., Jiang W. G. and Mason M. D. (2001) Matrilysin mediates extracellular cleavage of E-cadherin from prostate cancer cells: a key mechanism in hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell-cell dissociation and in vitro invasion. *Clin Cancer Res* 7, 3289-97.
- del Barrio M. G. and Nieto M. A. (2002) Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* 129, 1583-93.
- Demunter A., Libbrecht L., Degreef H., De Wolf-Peeters C. and van den Oord J. J. (2002) Loss of membranous expression of beta-catenin is associated with tumor progression in cutaneous melanoma and rarely caused by exon 3 mutations. *Mod Pathol* 15, 454-61.
- DeRisi J., Penland L., Brown P. O., Bittner M. L., Meltzer P. S., Ray M., Chen Y., Su Y. A. and Trent J. M. (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14, 457-60.
- DeRisi J. L., Iyer V. R. and Brown P. O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-6.
- Desai K. V., Xiao N., Wang W., Gangi L., Greene J., Powell J. I., Dickson R., Furth P., Hunter K., Kucherlapati R., Simon R., Liu E. T. and Green J. E. (2002) Initiating oncogenic event determines gene-expression patterns of human breast cancer models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6967-72.
- Detmar M., Brown L. F., Berse B., Jackman R. W., Elicker B. M., Dvorak H. F. and Claffey K. P. (1997) Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol* 108, 263-8.
- Deuel T. F., Zhang N., Yeh H. J., Silos-Santiago I. and Wang Z. Y. (2002) Pleiotrophin: a cytokine with diverse functions and a novel signaling pathway. *Arch Biochem Biophys* 397, 162-71.
- Dhanasekaran S. M., Barrette T. R., Ghosh D., Shah R., Varambally S., Kurachi K., Pienta K. J., Rubin M. A. and Chinnaiyan A. M. (2001) Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412, 822-6.
- Distler J. H., Hirth A., Kurowska-Stolarska M., Gay R. E., Gay S. and Distler O. (2003) Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 47, 149-61.
- Dobbin K., Shih J. H. and Simon R. (2003) Questions and answers on design of dual-label microarrays for identifying differentially expressed genes. *J Natl Cancer Inst* 95, 1362-9.
- Dobrowolski S. F., Banas R. A., Naylor E. W., Powdrill T. and Thakkar D. (1999) DNA microarray technology for neonatal screening. *Acta Paediatr Suppl* 88, 61-4.
- Dudley A. M., Aach J., Steffen M. A. and Church G. M. (2002) Measuring absolute expression with microarrays with a calibrated reference sample and an extended signal intensity range. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7554-9.
- Dudoit S., Gentleman R. C. and Quackenbush J. (2003) Open source software for the analysis of microarray data. *Biotechniques* Suppl, 45-51.
- Dvorak H. F. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315, 1650-9.
- Edelmann W., Yang K., Umar A., Heyer J., Lau K., Fan K., Liedtke W., Cohen P. E., Kane M. F., Lipford J. R., Yu N., Crouse G. F., Pollard J. W., Kunkel T., Lipkin M., Kolodner R. and Kucherlapati R. (1997) Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility. *Cell* 91, 467-77.
- Edwards D. (2003) Non-linear normalization and background correction in one-channel cDNA microarray studies. *Bioinformatics* 19, 825-33.
- Efstathiou J. A., Liu D., Wheeler J. M., Kim H. C., Beck N. E., Ilyas M., Karayiannakis A. J., Mortensen N. J., Kmiot W., Playford R. J., Pignatelli M. and Bodmer W. F. (1999) Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2316-21.
- Egeblad M. and Werb Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-74.
- Ehrlich J. S., Hansen M. D. and Nelson W. J. (2002) Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell* 3, 259-70.
- Eisen M. B., Spellman P. T., Brown P. O. and Botstein D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-8.
- El-Bahrawy M. A., Talbot I. C., Poulosom R., Jeffery R. and Alison M. R. (2002) The expression of E-cadherin and catenins in colorectal tumours from familial adenomatous polyposis patients. *J Pathol* 198, 69-76.
- Ellison G., Klinowska T., Westwood R. F., Docter E., French T. and Fox J. C. (2002) Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol Pathol* 55, 294-9.

## Literaturverzeichnis

---

- Even-Ram S. C., Maoz M., Pokroy E., Reich R., Katz B. Z., Gutwein P., Altevogt P. and Bar-Shavit R. (2001) Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with the alpha v beta 5 integrin. *J Biol Chem* 276, 10952-62.
- Fagotto F., Funayama N., Gluck U. and Gumbiner B. M. (1996) Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol* 132, 1105-14.
- Feldman A. L., Costouros N. G., Wang E., Qian M., Marincola F. M., Alexander H. R. and Libutti S. K. (2002) Advantages of mRNA amplification for microarray analysis. *Biotechniques* 33, 906-12, 914.
- Folkman J. (1998) Antiangiogenic gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9064-6.
- Frixen U. H., Behrens J., Sachs M., Eberle G., Voss B., Warda A., Lochner D. and Birchmeier W. (1991) E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113, 173-85.
- Fukudome Y., Yanagihara K., Takeichi M., Ito F. and Shibamoto S. (2000) Characterization of a mutant E-cadherin protein encoded by a mutant gene frequently seen in diffuse-type human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 88, 579-83.
- Fukushima Y., Ohnishi T., Arita N., Hayakawa T. and Sekiguchi K. (1998) Integrin alpha3beta1-mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion, migration and invasion of malignant glioma cells. *Int J Cancer* 76, 63-72.
- Funayama N., Fagotto F., McCrean P. and Gumbiner B. M. (1995) Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling. *J Cell Biol* 128, 959-68.
- Gabbiani G., Chaponnier C. and Huttner I. (1978) Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *J Cell Biol* 76, 561-8.
- Gallin W. J., Edelman G. M. and Cunningham B. A. (1983) Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1038-42.
- Gauthier-Rouviere C., Cavadore J. C., Blanchard J. M., Lamb N. J. and Fernandez A. (1991) p67SRF is a constitutive nuclear protein implicated in the modulation of genes required throughout the G1 period. *Cell Regul* 2, 575-88.
- Gayther S. A., Goringe K. L., Ramus S. J., Huntsman D., Roviello F., Grehan N., Machado J. C., Pinto E., Seruca R., Halling K., MacLeod P., Powell S. M., Jackson C. E., Ponder B. A. and Caldas C. (1998) Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* 58, 4086-9.
- Genschel J., Littman S. J., Drummond J. T. and Modrich P. (1998) Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J Biol Chem* 273, 19895-901.
- Gibson U. E., Heid C. A. and Williams P. M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6, 995-1001.
- Gill S., Peston D., Vonderhaar B. K. and Shousha S. (2001) Expression of prolactin receptors in normal, benign, and malignant breast tissue: an immunohistological study. *J Clin Pathol* 54, 956-60.
- Ginsburg E. and Vonderhaar B. K. (1995) Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Res* 55, 2591-5.
- Go M. F. (2002) Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 16 Suppl 1, 3-15.
- Goldfinger L. E., Hopkinson S. B., deHart G. W., Collawn S., Couchman J. R. and Jones J. C. (1999) The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *J Cell Sci* 112 ( Pt 16), 2615-29.
- Goldgar D. E., Easton D. F., Cannon-Albright L. A. and Skolnick M. H. (1994) Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* 86, 1600-8.
- Golembieski W. A., Ge S., Nelson K., Mikkelsen T. and Rempel S. A. (1999) Increased SPARC expression promotes U87 glioblastoma invasion in vitro. *Int J Dev Neurosci* 17, 463-72.
- Goliger J. A. and Paul D. L. (1995) Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol Biol Cell* 6, 1491-501.
- Gollmer J. C., Ladoux A., Gioanni J., Paquis P., Dubreuil A., Chatel M. and Frelin C. (2000) Expression of vascular endothelial growth factor-b in human astrocytoma. *Neuro-oncol* 2, 80-6.
- Golub T. R., Slonim D. K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J. P., Coller H., Loh M. L., Downing J. R., Caligiuri M. A., Bloomfield C. D. and Lander E. S. (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531-7.
- Gonias S. L., Wu L. and Salicioni A. M. (2004) Low density lipoprotein receptor-related protein: regulation of the plasma membrane proteome. *Thromb Haemost* 91, 1056-64.
- Gottardi C. J., Wong E. and Gumbiner B. M. (2001) E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 153, 1049-60.
- Graff J. R., Herman J. G., Lapidus R. G., Chopra H., Xu R., Jarrard D. F., Isaacs W. B., Pitha P. M., Davidson N. E. and Baylin S. B. (1995) E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 55, 5195-9.
- Grzeszkiewicz T. M., Kirschling D. J., Chen N. and Lau L. F. (2001) CYR61 stimulates human skin fibroblast migration through Integrin alpha v beta 5 and enhances mitogenesis through integrin alpha v beta 3, independent of its carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 276, 21943-50.
- Gu Q., Wang D., Gao Y., Zhou J., Peng R., Cui Y., Xia G., Qing Q., Yang H., Liu J. and Zhao M. (2002) Expression of MMP1 in surgical and radiation-impaired wound healing and its effects on the healing process. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 21, 71-8.
- Guilford P. J., Hopkins J. B., Grady W. M., Markowitz S. D., Willis J., Lynch H., Rajput A., Wiesner G. L., Lindor N. M., Burgart L. J., Toro T. T., Lee D., Limacher J. M., Shaw D. W., Findlay M. P. and Reeve A. E. (1999) E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat* 14, 249-55.
- Gumbiner B. M. (1995) Signal transduction of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 7, 634-40.
- Haenszel W., Kurihara M., Locke F. B., Shimuzu K. and Segi M. (1976) Stomach cancer in Japan. *J Natl Cancer Inst* 56, 265-74.
- Hajra K. M., Chen D. Y. and Fearon E. R. (2002) The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 62, 1613-8.
- Halgren R. G., Fielden M. R., Fong C. J. and Zacharewski T. R. (2001) Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones. *Nucleic Acids Res* 29, 582-8.
- Handschuh G., Candidus S., Lubber B., Reich U., Schott C., Oswald S., Becke H., Hutzler P., Birchmeier W., Hofler H. and Becker K. F. (1999) Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 18, 4301-12.
- Handschuh G., Lubber B., Hutzler P., Hofler H. and Becker K. F. (2001) Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences. *Journal of Molecular Biology* 314, 445-54.
- Harrington E. O., Loffler J., Nelson P. R., Kent K. C., Simons M. and Ware J. A. (1997) Enhancement of migration by protein kinase Calpha and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase Cdelta in capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 272, 7390-7.
- Harry L. E. and Paleolog E. M. (2003) From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis. *Birth Defects Res Part C Embryo Today* 69, 363-74.
- Hart M. J., de los Santos R., Albert I. N., Rubinfeld B. and Polakis P. (1998) Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 8, 573-81.
- Hasselaar P. and Sage E. H. (1992) SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem* 49, 272-83.
- Hay E. D. (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154, 8-20.
- Hayward R. E., Derisi J. L., Alfadhli S., Kaslow D. C., Brown P. O. and Rathod P. K. (2000) Shotgun DNA microarrays and stage-specific gene expression in *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol Microbiol* 35, 6-14.

## Literaturverzeichnis

---

- Heasman J., Crawford A., Goldstone K., Garner-Hamrick P., Gumbiner B., McCrea P., Kintner C., Noro C. Y. and Wylie C. (1994) Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 79, 791-803.
- Hedenfalk I., Duggan D., Chen Y., Radmacher M., Bittner M., Simon R., Meltzer P., Gusterson B., Esteller M., Kallioniemi O. P., Wilfond B., Borg A. and Trent J. (2001) Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 344, 539-48.
- Heid C. A., Stevens J., Livak K. J. and Williams P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-94.
- Hellberg C. B., Burden-Gulley S. M., Pietz G. E. and Brady-Kalnay S. M. (2002) Expression of the receptor protein-tyrosine phosphatase, PTPmu, restores E-cadherin-dependent adhesion in human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 277, 11165-73.
- Heller R. A., Schena M., Chai A., Shalon D., Bedilion T., Gilmore J., Woolley D. E. and Davis R. W. (1997) Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2150-5.
- Hemavathy K., Ashraf S. I. and Ip Y. T. (2000) Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257, 1-12.
- Hennig G., Behrens J., Truss M., Frisch S., Reichmann E. and Birchmeier W. (1995) Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo. *Oncogene* 11, 475-84.
- Herbst R. S., Yano S., Kuniyasu H., Khuri F. R., Bucana C. D., Guo F., Liu D., Kemp B., Lee J. J., Hong W. K. and Fidler I. J. (2000) Differential expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts outcome in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 6, 790-7.
- Hinck L., Nelson W. J. and 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, 729-41.
- Hinoda Y., Adachi Y., Takaoka A., Mitsuchi H., Satoh Y., Itoh F., Kondoh Y. and Imai K. (1998) Decreased expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in gastric cancer. *Cancer Lett* 129, 229-34.
- Hiraguri S., Godfrey T., Nakamura H., Graff J., Collins C., Shayesteh L., Doggett N., Johnson K., Wheelock M., Herman J., Baylin S., Pinkel D. and Gray J. (1998) Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 58, 1972-7.
- Hirohashi S. (1998) Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 153, 333-9.
- Huber O., Korn R., McLaughlin J., Ohsugi M., Herrmann B. G. and Kemler R. (1996) Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59, 3-10.
- Hunzelmann N., Hafner M., Anders S., Krieg T. and Nischt R. (1998) BM-40 (osteonectin, SPARC) is expressed both in the epidermal and in the dermal compartment of adult human skin. *J Invest Dermatol* 110, 122-6.
- Hurlin P. J., Queva C., Koskinen P. J., Steingrimsson E., Ayer D. E., Copeland N. G., Jenkins N. A. and Eisenman R. N. (1996) Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *Embo J* 15, 2030.
- Huynh M. H., Sage E. H. and Ringuette M. (1999) A calcium-binding motif in SPARC/osteonectin inhibits chordomesoderm cell migration during *Xenopus laevis* gastrulation: evidence of counter-adhesive activity in vivo. *Dev Growth Differ* 41, 407-18.
- Ihle J. N. and Kerr I. M. (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11, 69-74.
- Ikeda S., Kishida S., Yamamoto H., Murai H., Koyama S. and Kikuchi A. (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo J* 17, 1371-84.
- Imhof B. A., Vollmers H. P., Goodman S. L. and Birchmeier W. (1983) Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* 35, 667-75.
- Iruela-Arispe M. L., Vernon R. B., Wu H., Jaenisch R. and Sage E. H. (1996) Type I collagen-deficient Mov-13 mice do not retain SPARC in the extracellular matrix: implications for fibroblast function. *Dev Dyn* 207, 171-83.
- Iskandar H., Simpson R., Casu R., Bonnett R., Maclean D. and Manners J. (2004) Comparison of Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter* 22, 325-337.
- Ito K., Okamoto I., Araki N., Kawano Y., Nakao M., Fujiyama S., Tomita K., Mimori T. and Saya H. (1999) Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. *Oncogene* 18, 7080-90.
- Iyer V. R., Eisen M. B., Ross D. T., Schuler G., Moore T., Lee J. C., Trent J. M., Staudt L. M., Hudson J., Jr., Boguski M. S., Lashkari D., Shalon D., Botstein D. and Brown P. O. (1999) The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283, 83-7.
- Ji R. C., Miura M., Qu P. and Kato S. (2004) Expression of VEGFR-3 and 5'-nase in regenerating lymphatic vessels of the cutaneous wound healing. *Microsc Res Tech* 64, 279-86.
- Jiang J. and Struhl G. (1998) Regulation of the Hedgehog and Wnt signaling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* 391, 493-6.
- Jones E. G. (1964) Familial Gastric Cancer. *N Z Med J* 63, 287-96.
- Jones S. E. and Jomary C. (2002) Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 24, 811-20.
- Jonsson B. A., Adami H. O., Hagglund M., Bergh A., Goransson I., Stattin P., Wiklund F. and Gronberg H. (2004) -160C/A polymorphism in the E-cadherin gene promoter and risk of hereditary, familial and sporadic prostate cancer. *Int J Cancer* 109, 348-52.
- Jou T. S., Leung S. M., Fung L. M., Ruiz W. G., Nelson W. J. and Apodaca G. (2000) Selective alterations in biosynthetic and endocytic protein traffic in Madin-Darby canine kidney epithelial cells expressing mutants of the small GTPase Rac1. *Mol Biol Cell* 11, 287-304.
- Julius M. A., Schelbert B., Hsu W., Fitzpatrick E., Jho E., Fagotto F., Costantini F. and Kitajewski J. (2000) Domains of axin and disheveled required for interaction and function in wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 1162-9.
- Kambhampati S., Li Y., Verma A., Sassano A., Majchrzak B., Deb D. K., Parmar S., Giasis N., Kalvakolanu D. V., Rahman A., Uddin S., Minucci S., Tallman M. S., Fish E. N. and Platanius L. C. (2003) Activation of protein kinase C delta by all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem* 278, 32544-51.
- Kamihagi K., Katayama M., Ouchi R. and Kato I. (1994) Osteonectin/SPARC regulates cellular secretion rates of fibronectin and laminin extracellular matrix proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 200, 423-8.
- Kanai Y., Oda T., Tsuda H., Ochiai A. and Hirohashi S. (1994) Point mutation of the E-cadherin gene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Jpn J Cancer Res* 85, 1035-9.
- Kang Y. and Massague J. (2004) Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118, 277-9.
- Karpanen T., Egeblad M., Karkkainen M. J., Kubo H., Yla-Herttuala S., Jaattela M. and Alitalo K. (2001) Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 61, 1786-90.
- Keller G., Vogelsang H., Becker I., Hutter J., Ott K., Candidus S., Grundei T., Becker K. F., Mueller J., Siewert J. R. and Hoffer H. (1999) Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *American Journal of Pathology* 155, 337-42.
- Kerr M. K. and Churchill G. A. (2001a) Bootstrapping cluster analysis: assessing the reliability of conclusions from microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8961-5.
- Kerr M. K. and Churchill G. A. (2001b) Experimental design for gene expression microarrays. *Biostatistics* 2, 183-201.
- Kerr M. K. and Churchill G. A. (2001c) Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. *Genet Res* 77, 123-8.
- Kiley S. C., Clark K. J., Duddy S. K., Welch D. R. and Jaken S. (1999) Increased protein kinase C delta in mammary tumor cells: relationship to transformation and metastatic progression. *Oncogene* 18, 6748-57.
- Klein D., Leutenegger C. M., Bahula C., Gold P., Hofmann-Lehmann R., Salmons B., Lutz H. and Gunzburg W. H. (2001) Influence of preassay and sequence variations on viral load determination by a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for feline immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26, 8-20.

## Literaturverzeichnis

---

- Knott J. C., Mahesparan R., Garcia-Cabrera I., Bolge Tysnes B., Edvardsen K., Ness G. O., Mork S., Lund-Johansen M. and Bjerkvig R. (1998) Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *Int J Cancer* 75, 864-72.
- Koch A. W., Pokutta S., Lustig A. and Engel J. (1997) Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry* 36, 7697-705.
- Komarova E. A., Chernov M. V., Franks R., Wang K., Armin G., Zelnick C. R., Chin D. M., Bacus S. S., Stark G. R. and Gudkov A. V. (1997) Transgenic mice with p53-responsive lacZ: p53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity in vivo. *Embo J* 16, 1391-400.
- Kounnas M. Z., Henkin J., Argraves W. S. and Strickland D. K. (1993) Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular uptake of pro-urokinase. *J Biol Chem* 268, 21862-7.
- Kuhnert F., Davis C. R., Wang H. T., Chu P., Lee M., Yuan J., Nusse R. and Kuo C. J. (2004) Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 266-71.
- Kuniyasu H., Ellis L. M., Evans D. B., Abbruzzese J. L., Fenoglio C. J., Bucana C. D., Cleary K. R., Tahara E. and Fidler I. J. (1999) Relative expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts disease outcome in patients with resectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 5, 25-33.
- Kuniyasu H., Ukai R., Johnston D., Troncoso P., Fidler I. J. and Pettaway C. A. (2003) The relative mRNA expression levels of matrix metalloproteinase to E-cadherin in prostate biopsy specimens distinguishes organ-confined from advanced prostate cancer at radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 9, 2185-94.
- Kunz M., Moeller S., Koczan D., Lorenz P., Wenger R. H., Glocker M. O., Thiesen H. J., Gross G. and Ibrahim S. M. (2003) Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. *J Biol Chem* 278, 45651-60.
- Kyriakides T. R. and Bornstein P. (2003) Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb Haemost* 90, 986-92.
- La Vecchia C., Negri E., Franceschi S. and Gentile A. (1992) Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* 70, 50-5.
- Laaroubi K., Delbe J., Vacherot F., Desgranges P., Tardieu M., Jaye M., Barritault D. and Courty J. (1994) Mitogenic and in vitro angiogenic activity of human recombinant heparin affn regulatory peptide. *Growth Factors* 10, 89-98.
- Labbe E., Letamendia A. and Attisano L. (2000) Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8358-63.
- LaBonne C. and Bronner-Fraser M. (2000) Snail-related transcriptional repressors are required in Xenopus for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol* 221, 195-205.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lamaze C., Chuang T. H., Terlecky L. J., Bokoch G. M. and Schmid S. L. (1996) Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* 382, 177-9.
- Lane T. F. and Sage E. H. (1994) The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *Faseb J* 8, 163-73.
- Larjava H., Salo T., Haapasalmi K., Kramer R. H. and Heino J. (1993) Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J Clin Invest* 92, 1425-35.
- Latinkic B. V., Mo F. E., Greenspan J. A., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Ross S. R. and Lau L. F. (2001) Promoter function of the angiogenic inducer Cyr61 gene in transgenic mice: tissue specificity, inducibility during wound healing, and role of the serum response element. *Endocrinology* 142, 2549-57.
- Lau L. F. and Lam S. C. (1999) The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res* 248, 44-57.
- Laur'En P. (1965) The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64, 31-49.
- Laux H., Tomer R., Mader M. T., Smida J., Budczies J., Kappler R., Hahn H., Blochinger M., Schnitzbauer U., Eckardt-Schupp F., Hofler H. and Becker K. F. (2004) Tumor-associated E-cadherin mutations do not induce Wnt target gene expression, but affect E-cadherin repressors. *Lab Invest* 84, 1372-86.
- Leco K. J., Edwards D. R. and Schultz G. A. (1996) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is the major metalloproteinase inhibitor in the decidualizing murine uterus. *Mol Reprod Dev* 45, 458-65.
- Leco K. J., Khokha R., Pavloff N., Hawkes S. P. and Edwards D. R. (1994) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 269, 9352-60.
- Ledda M. F., Adris S., Bravo A. I., Kairiyama C., Bover L., Chernajovsky Y., Mordoh J. and Podhajcer O. L. (1997) Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med* 3, 171-6.
- Lee H. S., Lee H. K., Kim H. S., Yang H. K. and Kim W. H. (2003a) Tumour suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis. *J Pathol* 200, 39-46.
- Lee J. H., Seo Y. W., Park S. R., Kim Y. J. and Kim K. K. (2003b) Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res* 63, 7247-55.
- Lee K. H., Bae S. H., Lee J. L., Hyun M. S., Kim S. H., Song S. K. and Kim H. S. (2004) Relationship between urokinase-type plasminogen receptor, interleukin-8 gene expression and clinicopathological features in gastric cancer. *Oncology* 66, 210-7.
- Lee T. C., Li L., Philipson L. and Ziff E. B. (1997) Myc represses transcription of the growth arrest gene gas1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12886-91.
- Leibovich S. J. and Ross R. (1975) The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78, 71-100.
- Leir S. H., Baker J. E., Holgate S. T. and Lackie P. M. (2000) Increased CD44 expression in human bronchial epithelial repair after damage or plating at low cell densities. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L1129-37.
- Lewis J. M., Truong T. N. and Schwartz M. A. (2002) Integrins regulate the apoptotic response to DNA damage through modulation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3627-32.
- Li L. C., Chui R. M., Sasaki M., Nakajima K., Perincher G., Au H. C., Nojima D., Carroll P. and Dahiya R. (2000) A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities. *Cancer Res* 60, 873-6.
- Liby K., Neltner B., Mohamet L., Menchen L. and Ben-Jonathan N. (2003) Prolactin overexpression by MDA-MB-435 human breast cancer cells accelerates tumor growth. *Breast Cancer Res Treat* 79, 241-52.
- Lim S., Lee H. S., Kim H. S., Kim Y. I. and Kim W. H. (2003) Alteration of E-cadherin-mediated adhesion protein is common, but microsatellite instability is uncommon in young age gastric cancers. *Histopathology* 42, 128-36.
- Lin Y. H., Park Z. Y., Lin D., Brahmabhatt A. A., Rio M. C., Yates J. R., 3rd and Klemke R. L. (2004) Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1. *J Cell Biol* 165, 421-32.
- Lindblad-Toh K., Tanenbaum D. M., Daly M. J., Winchester E., Lui W. O., Villapakkam A., Stanton S. E., Larsson C., Hudson T. J., Johnson B. E., Lander E. S. and Meyerson M. (2000a) Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol* 18, 1001-5.
- Lindblad-Toh K., Winchester E., Daly M. J., Wang D. G., Hirschhorn J. N., Lavolette J. P., Ardlie K., Reich D. E., Robinson E., Sklar P., Shah N., Thomas D., Fan J. B., Gingeras T., Warrington J., Patil N., Hudson T. J. and Lander E. S. (2000b) Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse. *Nat Genet* 24, 381-6.
- Little R. J. and Rubin D. B. (1987) Statistical analysis with missing data.
- Llorens A., Rodrigo I., Lopez-Barcons L., Gonzalez-Garrigues M., Lozano E., Vinyals A., Quintanilla M., Cano A. and Fabra A. (1998) Down-regulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linked to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression. *Lab Invest* 78, 1131-42.

## Literaturverzeichnis

---

- Llovera M., Pichard C., Bernichtein S., Jeay S., Touraine P., Kelly P. A. and Goffin V. (2000) Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 19, 4695-705.
- Lo A. W., Magliano D. J., Sibson M. C., Kalitsis P., Craig J. M. and Choo K. H. (2001) A novel chromatin immunoprecipitation and array (CIA) analysis identifies a 460-kb CENP-A-binding neocentromere DNA. *Genome Res* 11, 448-57.
- Lochter A., Galosy S., Muschler J., Freedman N., Werb Z. and Bissell M. J. (1997) Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 139, 1861-72.
- Lock C., Hermans G., Pedotti R., Brendolan A., Schadt E., Garren H., Langer-Gould A., Strober S., Cannella B., Allard J., Klonowski P., Austin A., Lad N., Kaminski N., Galli S. J., Oksenberg J. R., Raine C. S., Heller R. and Steinman L. (2002) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8, 500-8.
- Luber B., Candidus S., Handschuh G., Mentele E., Hutzler P., Feller S., Voss J., Hofler H. and Becker K. F. (2000) Tumor-derived mutated E-cadherin influences beta-catenin localization and increases susceptibility to actin cytoskeletal changes induced by pervanadate. *Cell Adhesion and Communication* 7, 391-408.
- Luo J., Lubaroff D. M. and Hendrix M. J. (1999) Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-cadherin transfection. *Cancer Res* 59, 3552-6.
- Luttun A., Dewerchin M., Collen D. and Carmeliet P. (2000) The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep* 2, 407-16.
- MacBeath G. (2002) Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* 32, 526-32.
- Manduchi E., Scearce L. M., Brestelli J. E., Grant G. R., Kaestner K. H. and Stoeckert C. J., Jr. (2002) Comparison of different labeling methods for two-channel high-density microarray experiments. *Physiol Genomics* 10, 169-79.
- Mao B., Wu W., Li Y., Hoppe D., Stannek P., Glinka A. and Niehrs C. (2001a) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411, 321-5.
- Mao J., Wang J., Liu B., Pan W., Farr G. H., 3rd, Flynn C., Yuan H., Takada S., Kimelman D., Li L. and Wu D. (2001b) Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7, 801-9.
- Marsischky G. T., Filosi N., Kane M. F. and Kolodner R. (1996) Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev* 10, 407-20.
- Martin P. (1997) Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.
- Massi D., Franchi A., Borgognoni L., Reali U. M. and Santucci M. (1999) Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol* 30, 339-44.
- Mattila M. M., Ruohola J. K., Karpanen T., Jackson D. G., Alitalo K. and Harkonen P. L. (2002) VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer* 98, 946-51.
- Maus M. V., Reilly S. C. and Clevenger C. V. (1999) Prolactin as a chemoattractant for human breast carcinoma. *Endocrinology* 140, 5447-50.
- McElligott A. M., Baker A. H. and McGlynn H. (1997) Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase regulation of the invasive potential of a metastatic renal cell line. *Biochem Soc Trans* 25, 147S.
- McMahon A. P. and Moon R. T. (1989) Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* 58, 1075-84.
- Meiners S., Brinkmann V., Naundorf H. and Birchmeier W. (1998) Role of morphogenetic factors in metastasis of mammary carcinoma cells. *Oncogene* 16, 9-20.
- Meng K., Rodriguez-Pena A., Dimitrov T., Chen W., Yamin M., Noda M. and Deuel T. F. (2000) Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2603-8.
- Merdek K. D., Nguyen N. T. and Toksoz D. (2004) Distinct activities of the alpha-catenin family, alpha-catenin and alpha-catenin, on beta-catenin-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 24, 2410-22.
- Michael D. and Oren M. (2002) The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 12, 53-9.
- Miki R., Kadota K., Bono H., Mizuno Y., Tomaru Y., Carninci P., Itoh M., Shibata K., Kawai J., Konno H., Watanabe S., Sato K., Tokusumi Y., Kikuchi N., Ishii Y., Hamaguchi Y., Nishizuka I., Goto H., Nitanda H., Satomi S., Yoshiki A., Kusakabe M., DeRisi J. L., Eisen M. B., Iyer V. R., Brown P. O., Muramatsu M., Shimada H., Okazaki Y. and Hayashizaki Y. (2001) Delineating developmental and metabolic pathways in vivo by expression profiling using the RIKEN set of 18,816 full-length enriched mouse cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2199-204.
- Miller J. R., Hocking A. M., Brown J. D. and Moon R. T. (1999) Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways. *Oncogene* 18, 7860-72.
- Mischak H., Goodnight J. A., Kolch W., Martiny-Baron G., Schaechtle C., Kazanietz M. G., Blumberg P. M., Pierce J. H. and Mushinski J. F. (1993) Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 268, 6090-6.
- Miyaki M., Tanaka K., Kikuchi-Yanoshita R., Muraoka M., Konishi M. and Takeichi M. (1995) Increased cell-substratum adhesion, and decreased gelatinase secretion and cell growth, induced by E-cadherin transfection of human colon carcinoma cells. *Oncogene* 11, 2547-52.
- Mizushima H., Takamura H., Miyagi Y., Kikkawa Y., Yamanaka N., Yasumitsu H., Misugi K. and Miyazaki K. (1997) Identification of integrin-dependent and -independent cell adhesion domains in COOH-terminal globular region of laminin-5 alpha 3 chain. *Cell Growth Differ* 8, 979-87.
- Mizutani K., Kofuji K. and Shirouzu K. (2000) The significance of MMP-1 and MMP-2 in peritoneal disseminated metastasis of gastric cancer. *Surg Today* 30, 614-21.
- Mohanam S., Chintala S. K., Go Y., Bhattacharya A., Venkaiah B., Boyd D., Gokaslan Z. L., Sawaya R. and Rao J. S. (1997) In vitro inhibition of human glioblastoma cell line invasiveness by antisense uPA receptor. *Oncogene* 14, 1351-9.
- Mohanam S., Sawaya R., McCutcheon I., Ali-Osman F., Boyd D. and Rao J. S. (1993) Modulation of in vitro invasion of human glioblastoma cells by urokinase-type plasminogen activator receptor antibody. *Cancer Res* 53, 4143-7.
- Molenaar M., van de Wetering M., Oosterwegel M., Peterson-Maduro J., Godsave S., Korinek V., Roose J., Destree O. and Clevers H. (1996) XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391-9.
- Morell-Quadreny L., Rubio J., Lopez-Guerrero J. A., Casanova J., Ramos D., Iborra I., Solsona E. and Llombart-Bosch A. (2003) Disruption of basement membrane, extracellular matrix metalloproteinases and E-cadherin in renal-cell carcinoma. *Anticancer Res* 23, 5005-10.
- Morini M., Mottolese M., Ferrari N., Ghiorzo F., Buglioni S., Mortarini R., Noonan D. M., Natali P. G. and Albini A. (2000) The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. *Int J Cancer* 87, 336-42.
- Mukhopadhyay R., Theriault R. L. and Price J. E. (1999) Increased levels of alpha6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 17, 325-32.
- Mullis K. B. and Faloona F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-50.
- Muta H., Noguchi M., Kanai Y., Ochiai A., Nawata H. and Hirohashi S. (1996) E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Jpn J Cancer Res* 87, 843-8.
- Nagano M., Chastre E., Choquet A., Bara J., Gespach C. and Kelly P. A. (1995) Expression of prolactin and growth hormone receptor genes and their isoforms in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 268, G431-42.
- Nawrocki B., Polette M., Marchand V., Monteau M., Gillery P., Tournier J. M. and Birembaut P. (1997) Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantitative and morphological analyses. *Int J Cancer* 72, 556-64.

## Literaturverzeichnis

---

- Nawrocki-Raby B., Gilles C., Polette M., Martinella-Catusse C., Bonnet N., Puchelle E., Foidart J. M., Van Roy F. and Birembaut P. (2003) E-Cadherin mediates MMP down-regulation in highly invasive bronchial tumor cells. *Am J Pathol* 163, 653-61.
- Newswire P. (2004) World's First Diagnostic Microarray System Launched by Affymetrix in European Union. *Belga Press*.
- Nieto M. A. (2002) The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 155-66.
- Nieto M. A., Sargent M. G., Wilkinson D. G. and Cooke J. (1994) Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835-9.
- Noe V., Fingleton B., Jacobs K., Crawford H. C., Vermeulen S., Steelant W., Bruyneel E., Matrisian L. M. and Mareel M. (2001) Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 114, 111-118.
- Nollet F., Kools P. and van Roy F. (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 299, 551-72.
- Oda H., Tsukita S. and Takeichi M. (1998) Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation. *Dev Biol* 203, 435-50.
- Ohira T., Gemmill R. M., Ferguson K., Kusy S., Roche J., Brambilla E., Zeng C., Baron A., Bemis L., Erickson P., Wilder E., Rustgi A., Kitajewski J., Gabrielson E., Bremnes R., Franklin W. and Drabkin H. A. (2003) WNT7a induces E-cadherin in lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10429-34.
- Oka H., Shiozaki H., Kobayashi K., Inoue M., Tahara H., Kobayashi T., Takatsuka Y., Matsuyoshi N., Hirano S., Takeichi M. and et al. (1993) Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 53, 1696-701.
- Okada A., Bellocq J. P., Rouyer N., Chenard M. P., Rio M. C., Chambon P. and Basset P. (1995) Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2730-4.
- Okada Y., Gonoji Y., Naka K., Tomita K., Nakanishi I., Iwata K., Yamashita K. and Hayakawa T. (1992) Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem* 267, 21712-9.
- O'Leary R., Arrowsmith M. and Wood E. J. (2002) Characterization of the living skin equivalent as a model of cutaneous re-epithelialization. *Cell Biochem Funct* 20, 129-41.
- Orford K., Crockett C., Jensen J. P., Weissman A. M. and Byers S. W. (1997) Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* 272, 24735-8.
- Orsulic S., Huber O., Aberle H., Arnold S. and Kemler R. (1999) E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci* 112 ( Pt 8), 1237-45.
- Ossowski L. and Aguirre-Ghiso J. A. (2000) Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* 12, 613-20.
- Ozawa M. and Kemler R. (1990) Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *J Cell Biol* 111, 1645-50.
- Paavonen K., Puolakkainen P., Jussila L., Jahkola T. and Alitalo K. (2000) Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 156, 1499-504.
- Papkoff J., Rubinfeld B., Schryver B. and Polakis P. (1996) Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Mol Cell Biol* 16, 2128-34.
- Pareek R., Wellnitz O., Dorp R. V., Burton J. and Kerr D. (2005) Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells. *J Appl Genet* 46, 171-177.
- Parganas E., Wang D., Stravopodis D., Topham D. J., Marine J. C., Teglund S., Vanin E. F., Bodner S., Colamonic O. R., van Deursen J. M., Grosveld G. and Ihle J. N. (1998) Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, 385-95.
- Park W. S., Cho Y. G., Park J. Y., Kim C. J., Lee J. H., Kim H. S., Lee J. W., Song Y. H., Park C. H., Park Y. K., Kim S. Y., Nam S. W., Lee S. H., Yoo N. J. and Lee J. Y. (2003) A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter-160 is not associated with risk of Korean gastric cancer. *J Korean Med Sci* 18, 501-4.
- Parsonnet J. (1996) Helicobacter pylori in the stomach--a paradox unmasked. *N Engl J Med* 335, 278-80.
- Pertz O., Bozic D., Koch A. W., Fauser C., Brancaccio A. and Engel J. (1999) A new crystal structure, Ca<sup>2+</sup> dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J* 18, 1738-47.
- Pharoah P. D., Oliveira C., Machado J. C., Keller G., Vogelsang H., Laux H., Becker K. F., Hahn H., Paproski S. M., Brown L. A., Caldas C. and Huntsman D. (2002) CDH1 c-160a promoter polymorphism is not associated with risk of stomach cancer. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 101, 196-7.
- Phillips K. K., Welch D. R., Miele M. E., Lee J. H., Wei L. L. and Weissman B. E. (1996) Suppression of MDA-MB-435 breast carcinoma cell metastasis following the introduction of human chromosome 11. *Cancer Res* 56, 1222-7.
- Pilcher B. K., Dumin J. A., Sudbeck B. D., Krane S. M., Welgus H. G. and Parks W. C. (1997) The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* 137, 1445-57.
- Pinson K. I., Brennan J., Monkley S., Avery B. J. and Skarnes W. C. (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407, 535-8.
- Pokutta S., Herrenknecht K., Kemler R. and Engel J. (1994) Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* 223, 1019-26.
- Polette M., Nawrocki-Raby B., Gilles C., Clavel C. and Birembaut P. (2004) Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 49, 179-86.
- Pollack J. R., Perou C. M., Alizadeh A. A., Eisen M. B., Pergamenschikov A., Williams C. F., Jeffrey S. S., Botstein D. and Brown P. O. (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23, 41-6.
- Pollock P. M. and Hayward N. (2002) Mutations in exon 3 of the beta-catenin gene are rare in melanoma cell lines. *Melanoma Res* 12, 183-6.
- Porfiri E., Rubinfeld B., Albert I., Hovanes K., Waterman M. and Polakis P. (1997) Induction of a beta-catenin-LEF-1 complex by wnt-1 and transforming mutants of beta-catenin. *Oncogene* 15, 2833-9.
- Porter P. L., Sage E. H., Lane T. F., Funk S. E. and Gown A. M. (1995) Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem* 43, 791-800.
- Poser I., Dominguez D., de Herreros A. G., Varnai A., Buettner R. and Bosserhoff A. K. (2001) Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 276, 24661-6.
- Poser S., Impey S., Trinh K., Xia Z. and Storm D. R. (2000) SRF-dependent gene expression is required for PI3-kinase-regulated cell proliferation. *Embo J* 19, 4955-66.
- Prochownik E. V., Eagle Grove L., Deubler D., Zhu X. L., Stephenson R. A., Rohr L. R., Yin X. and Brothman A. R. (1998) Commonly occurring loss and mutation of the MXI1 gene in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 22, 295-304.
- Prokopishyn N. L., Puzon-McLaughlin W., Takada Y. and Laferte S. (1999) Integrin alpha3beta1 expressed by human colon cancer cells is a major carrier of oncodevelopmental carbohydrate epitopes. *J Cell Biochem* 72, 189-209.
- Pujuguet P., Del Maestro L., Gautreau A., Louvard D. and Arpin M. (2003) Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell* 14, 2181-91.
- Qi J. H., Ebrahim Q., Moore N., Murphy G., Claesson-Welsh L., Bond M., Baker A. and Anand-Apte B. (2003) A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 9, 407-15.

## Literaturverzeichnis

---

- Qiu X., Yang X., Li Q. and Wang E. (2002) [A study of E-cadherin and beta-catenin expression and their correlation with prognosis of nonsmall cell lung carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 31, 318-21.
- Quackenbush J. (2001) Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* 2, 418-27.
- Quackenbush J. (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 32, 496-501.
- Raines E. W., Lane T. F., Iruela-Arispe M. L., Ross R. and Sage E. H. (1992) The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1281-5.
- Rappolee D. A., Mark D., Banda M. J. and Werb Z. (1988) Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 241, 708-12.
- Ravanti L. and Kahari V. M. (2000) Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med* 6, 391-407.
- Reed M. J., Puolakkainen P., Lane T. F., Dickerson D., Bornstein P. and Sage E. H. (1993) Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 41, 1467-77.
- Religio A., Schwager C., Richter A., Ansorge W. and Valcarcel J. (2002) Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 30, e51.
- Rempel S. A., Ge S. and Gutierrez J. A. (1999) SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res* 5, 237-41.
- Reynolds C., Montone K. T., Powell C. M., Tomaszewski J. E. and Clevenger C. V. (1997) Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. *Endocrinology* 138, 5555-60.
- Rhyu M. G., Park W. S., Jung Y. J., Choi S. W. and Meltzer S. J. (1994) Allelic deletions of MCC/APC and p53 are frequent late events in human gastric carcinogenesis. *Gastroenterology* 106, 1584-8.
- Richards F. M., McKee S. A., Rajpar M. H., Cole T. R., Evans D. G., Jankowski J. A., McKeown C., Sanders D. S. and Maher E. R. (1999) Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 8, 607-10.
- Rickman D. S., Herbert C. J. and Aggerbeck L. P. (2003) Optimizing spotting solutions for increased reproducibility of cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 31, e109.
- Risinger J. I., Berchuck A., Kohler M. F. and Boyd J. (1994) Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet* 7, 98-102.
- Rizki A. and Lundblad V. (2001) Defects in mismatch repair promote telomerase-independent proliferation. *Nature* 411, 713-6.
- Robinson W. H., DiGennaro C., Hueber W., Haab B. B., Kamachi M., Dean E. J., Fournel S., Fong D., Genovese M. C., de Vegvar H. E., Skinner K., Hirschberg D. L., Morris R. I., Muller S., Puijig G. J., van Venrooij W. J., Smolen J. S., Brown P. O., Steinman L. and Utz P. J. (2002) Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 8, 295-301.
- Rosenblatt S., Bassuk J. A., Alpers C. E., Sage E. H., Timpl R. and Preissner K. T. (1997) Differential modulation of cell adhesion by interaction between adhesive and counter-adhesive proteins: characterization of the binding of vitronectin to osteonectin (BM40, SPARC). *Biochem J* 324 ( Pt 1), 311-9.
- Rosivatz E., Becker I., Specht K., Fricke E., Luber B., Busch R., Hofler H. and Becker K. F. (2002) Differential Expression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Regulators Snail, SIP1, and Twist in Gastric Cancer. *American Journal of Pathology* 161, 1881-91.
- Ross D. T., Scherf U., Eisen M. B., Perou C. M., Rees C., Spellman P., Iyer V., Jeffrey S. S., Van de Rijn M., Waltham M., Pergamenschikov A., Lee J. C., Lashkari D., Shalon D., Myers T. G., Weinstein J. N., Botstein D. and Brown P. O. (2000) Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 24, 227-35.
- Rouillard J. M., Herbert C. J. and Zuker M. (2002) OligoArray: genome-scale oligonucleotide design for microarrays. *Bioinformatics* 18, 486-7.
- Rubinfeld B., Albert I., Porfiri E., Fiol C., Munemitsu S. and Polakis P. (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272, 1023-6.
- Rubinfeld B., Robbins P., El-Gamil M., Albert I., Porfiri E. and Polakis P. (1997) Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275, 1790-2.
- Rubinfeld B., Souza B., Albert I., Muller O., Chamberlain S. H., Masiarz F. R., Munemitsu S. and Polakis P. (1993) Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262, 1731-4.
- Ryniers F., Stove C., Goethals M., Brackenier L., Noe V., Bracke M., Vandekerckhove J., Mareel M. and Bruyneel E. (2002) Plasmin produces an E-cadherin fragment that stimulates cancer cell invasion. *Biol Chem* 383, 159-65.
- Saal L. H., Troein C., Vallon-Christersson J., Gruvberger S., Borg A. and Peterson C. (2002) BioArray Software Environment (BASE): a platform for comprehensive management and analysis of microarray data. *Genome Biol* 3, SOFTWARE0003. Epub 2002 Jul 15.
- Saeed A. I., Sharov V., White J., Li J., Liang W., Bhagabati N., Braisted J., Klapa M., Currier T., Thiagarajan M., Sturn A., Snuffin M., Rezantsev A., Popov D., Ryltsov A., Kostukovich E., Borisovsky I., Liu Z., Vinsavich A., Trush V. and Quackenbush J. (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374-8.
- Sage E. H. (1997) Terms of attachment: SPARC and tumorigenesis. *Nat Med* 3, 144-6.
- Sage E. H., Reed M., Funk S. E., Truong T., Steadele M., Puolakkainen P., Maurice D. H. and Bassuk J. A. (2003) Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis. *J Biol Chem* 278, 37849-57.
- Sakanaka C., Weiss J. B. and Williams L. T. (1998) Bridging of beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta by axin and inhibition of beta-catenin-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3020-3.
- Sambrook J. F. E., Maniatis T. (1989) *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- Sano T., Tsujino T., Yoshida K., Nakayama H., Haruma K., Ito H., Nakamura Y., Kajiyama G. and Tahara E. (1991) Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 51, 2926-31.
- Schena M. (1996) Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessays* 18, 427-31.
- Schena M., Shalon D., Davis R. W. and Brown P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-70.
- Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P. O. and Davis R. W. (1996) Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10614-9.
- Schipper J. H., Frixen U. H., Behrens J., Unger A., Jahnke K. and 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, 6328-37.
- Schuh D., Herrmann W. R., Kunze K. D. and Zotter S. (1986) [The importance of autopsy for quality assurance in medical care]. *Zentralbl Allg Pathol* 132, 253-65.
- Schulte A. M., Lai S., Kurtz A., Czubayko F., Riegel A. T. and Wellstein A. (1996) Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14759-64.
- Schwartz D. R., Wu R., Kardia S. L., Levin A. M., Huang C. C., Shedden K. A., Kuick R., Misek D. E., Hanash S. M., Taylor J. M., Reed H., Hendrix N., Zhai Y., Fearon E. R. and Cho K. R. (2003) Novel candidate targets of beta-catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* 63, 2913-22.
- Semenov M. V., Tamai K., Brott B. K., Kuhl M., Sokol S. and He X. (2001) Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 11, 951-61.
- Shankavaram U. T., DeWitt D. L., Funk S. E., Sage E. H. and Wahl L. M. (1997) Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *J Cell Physiol* 173, 327-34.
- Shannon M. F. and Rao S. (2002) Transcription. Of chips and ChIPs. *Science* 296, 666-9.
- Shaw L. M., Chao C., Wewer U. M. and Mercurio A. M. (1996) Function of the integrin alpha 6 beta 1 in metastatic breast carcinoma cells assessed by expression of a dominant-negative receptor. *Cancer Res* 56, 959-63.

## Literaturverzeichnis

- Shipp M. A., Ross K. N., Tamayo P., Weng A. P., Kutok J. L., Aguiar R. C., Gaasenbeek M., Angelo M., Reich M., Pinkus G. S., Ray T. S., Koval M. A., Last K. W., Norton A., Lister T. A., Mesirov J., Neuberger D. S., Lander E. S., Aster J. C. and Golub T. R. (2002) Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 8, 68-74.
- Singer A. J. and Clark R. A. (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341, 738-46.
- Skobe M., Hawighorst T., Jackson D. G., Prevo R., Janes L., Velasco P., Riccardi L., Alitalo K., Claffey K. and Detmar M. (2001) Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 7, 192-8.
- Smyth G. K. and Speed T. (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31, 265-73.
- Soukas A., Cohen P., Socci N. D. and Friedman J. M. (2000) Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev* 14, 963-80.
- Soulez M., Rouviere C. G., Chafey P., Hentzen D., Vandromme M., Lautredou N., Lamb N., Kahn A. and Tuil D. (1996) Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Mol Cell Biol* 16, 6065-74.
- Southern E. M. (2000) Blotting at 25. *Trends Biochem Sci* 25, 585-8.
- Souttou B., Juhl H., Hackenbruck J., Rockseisen M., Klomp H. J., Raulais D., Vigny M. and Wellstein A. (1998) Relationship between serum concentrations of the growth factor pleiotrophin and pleiotrophin-positive tumors. *J Natl Cancer Inst* 90, 1468-73.
- Spurbeck W. W., Ng C. Y., Strom T. S., Vanin E. F. and Davidoff A. M. (2002) Enforced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 affects functional capillary morphogenesis and inhibits tumor growth in a murine tumor model. *Blood* 100, 3361-8.
- Sterk L. M., Geuijen C. A., Oomen L. C., Calafat J., Janssen H. and Sonnenberg A. (2000) The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol* 149, 969-82.
- Sterk L. M., Geuijen C. A., van den Berg J. G., Claessen N., Weening J. J. and Sonnenberg A. (2002) Association of the tetraspanin CD151 with the laminin-binding integrins alpha3beta1, alpha6beta1, alpha6beta4 and alpha7beta1 in cells in culture and in vivo. *J Cell Sci* 115, 1161-73.
- Sternlicht M. D. and Werb Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.
- Stillman B. A. and Tonkinson J. L. (2001) Expression microarray hybridization kinetics depend on length of the immobilized DNA but are independent of immobilization substrate. *Anal Biochem* 295, 149-57.
- Struman I., Bentzien F., Lee H., Mainfroid V., D'Angelo G., Goffin V., Weiner R. I. and Martial J. A. (1999) Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1246-51.
- Su L. K., Vogelstein B. and Kinzler K. W. (1993) Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262, 1734-7.
- Sun Y., Hegamyer G., Kim H., Sithanandam K., Li H., Watts R. and Colburn N. H. (1995) Molecular cloning of mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and its promoter. Specific lack of expression in neoplastic JB6 cells may reflect altered gene methylation. *J Biol Chem* 270, 19312-9.
- Suzuki K., Enghild J. J., Morodomi T., Salvesen G. and Nagase H. (1990) Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 29, 10261-70.
- Takahashi T., Nakamura T., Hayashi A., Kamei M., Nakabayashi M., Okada A. A., Tomita N., Kaneda Y. and Tano Y. (2000) Inhibition of experimental choroidal neovascularization by overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in retinal pigment epithelium cells. *Am J Ophthalmol* 130, 774-81.
- Takaishi K., Sasaki T., Kotani H., Nishioka H. and Takai Y. (1997) Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* 139, 1047-59.
- Takaoka A., Hinoda Y., Sato S., Itoh F., Adachi M., Hareyama M. and Imai K. (1998a) Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. *Jpn J Cancer Res* 89, 397-404.
- Takaoka A., Hinoda Y., Satoh S., Adachi Y., Itoh F., Adachi M. and Imai K. (1998b) Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene* 16, 1443-53.
- Takeda H., Shimoyama Y., Nagafuchi A. and Hirohashi S. (1999) E-cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface in vivo. *Nat Struct Biol* 6, 310-2.
- Takeichi M. (1990) Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 59, 237-52.
- Takeichi M. (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251, 1451-5.
- Takeichi M. (1993) Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 5, 806-11.
- Tamai K., Semenov M., Kato Y., Spokony R., Liu C., Katsuyama Y., Hess F., Saint-Jeannet J. P. and He X. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530-5.
- Tamura G., Sakata K., Nishizuka S., Maesawa C., Suzuki Y., Iwaya T., Terashima M., Saito K. and Satodate R. (1996) Inactivation of the E-cadherin gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 87, 1153-9.
- Thiery J. P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-54.
- Thorlacius S., Olafsdottir G., Tryggvadottir L., Neuhausen S., Jonasson J. G., Tavtigian S. V., Tulinius H., Ogmundsdottir H. M. and Eyfjord J. E. (1996) A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet* 13, 117-9.
- Todd R., Lingen M. W. and Kuo W. P. (2002) Gene expression profiling using laser capture microdissection. *Expert Rev Mol Diagn* 2, 497-507.
- Tong X., O'Kelly J., Xie D., Mori A., Lemp N., McKenna R., Miller C. W. and Koeffler H. P. (2004) Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the beta-catenin-c-myc-p53 pathway. *Oncogene* 23, 4847-55.
- Torres M. A., Yang-Snyder J. A., Purcell S. M., DeMarais A. A., McGrew L. L. and Moon R. T. (1996) Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* 133, 1123-37.
- Touraine P., Martini J. F., Zafrani B., Durand J. C., Labaille F., Malet C., Nicolas A., Trivin C., Postel-Vinay M. C., Kuttann F. and Kelly P. A. (1998) Increased expression of prolactin receptor gene assessed by quantitative polymerase chain reaction in human breast tumors versus normal breast tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 667-74.
- Tremble P. M., Lane T. F., Sage E. H. and Werb Z. (1993) SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol* 121, 1433-44.
- Tseng G. C., Oh M. K., Rohlin L., Liao J. C. and Wong W. H. (2001) Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res* 29, 2549-57.
- Tsurusaki T., Kanda S., Sakai H., Kanetake H., Saito Y., Alitalo K. and Koji T. (1999) Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer* 80, 309-13.
- Turkson J. and Jove R. (2000) STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 19, 6613-26.
- Tysnes B. B., Larsen L. F., Ness G. O., Mahesparan R., Edvardsen K., Garcia-Cabrera I. and Bjerkvig R. (1996) Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies. *Int J Cancer* 67, 777-84.
- Uematsu K., He B., You L., Xu Z., McCormick F. and Jablons D. M. (2003) Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene* 22, 7218-21.
- Ura H., Denno R., Hirata K., Yamaguchi K. and Yasoshima T. (1998) Separate functions of alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins in the metastatic process of human gastric carcinoma. *Surg Today* 28, 1001-6.
- van de Wetering M., Barker N., Harkes I. C., van der Heyden M., Dijk N. J., Hollestelle A., Klijn J. G., Clevers H. and Schutte M. (2001) Mutant E-cadherin based cancer cells do not display constitutive Wnt signaling. *Cancer Res* 61, 278-84.

## Literaturverzeichnis

---

- van 't Veer L. J., Dai H., van de Vijver M. J., He Y. D., Hart A. A., Mao M., Peterse H. L., van der Kooy K., Marton M. J., Witteveen A. T., Schreiber G. J., Kerkhoven R. M., Roberts C., Linsley P. S., Bernards R. and Friend S. H. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-6.
- Varis A., Wolf M., Monni O., Vakkari M. L., Kokkola A., Moskaluk C., Frierson H., Jr., Powell S. M., Knuutila S., Kallioniemi A. and El-Rifai W. (2002) Targets of gene amplification and overexpression at 17q in gastric cancer. *Cancer Res* 62, 2625-9.
- Varley J. M., McGown G., Thorncroft M., Tricker K. J., Teare M. D., Santibanez-Koref M. F., Martin J., Birch J. M. and Evans D. G. (1995) An extended Li-Fraumeni kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53. *J Med Genet* 32, 942-5.
- Verhage B. A., van Houwelingen K., Ruijter T. E., Kiemeny L. A. and Schalken J. A. (2002) Single-nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter modifies the risk of prostate cancer. *Int J Cancer* 100, 683-5.
- Vial E. and Castellazzi M. (2000) Down-regulation of the extracellular matrix protein SPARC in vSrc- and vJun-transformed chick embryo fibroblasts contributes to tumor formation in vivo. *Oncogene* 19, 1772-82.
- Vleminckx K., Vakaet L., Jr., Mareel M., Fiers W. and van Roy F. (1991) Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66, 107-19.
- Vonderhaar B. K. (1998) Prolactin: the forgotten hormone of human breast cancer. *Pharmacol Ther* 79, 169-78.
- Wang C. S., Lin K. H., Chen S. L., Chan Y. F. and Hsueh S. (2004) Overexpression of SPARC gene in human gastric carcinoma and its clinic-pathologic significance. *Br J Cancer* 91, 1924-30.
- Wang D., Liu S., Trummer B. J., Deng C. and Wang A. (2002a) Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells. *Nat Biotechnol* 20, 275-81.
- Wang D. Y., Xiang Y. Y., Li X. J., Hashimoto M., Tanaka M. and Sugimura H. (2000) Mx11 is a potential cellular target of carcinogens and frequently mutated in experimental rat tumors and tumor cell lines. *Pathol Int* 50, 373-83.
- Wang L. H., Liu D. Y., Chen Y. J., Hou L., Wang B., Mao L. M. and Lu S. (2002b) [Relationship between lymph node metastasis and the expressions of E-cadherin, N-cadherin, and matrix metalloproteinase in breast carcinoma]. *Ai Zheng* 21, 965-9.
- Wang Z., Symons J. M., Goldstein S. L., McDonald A., Miner J. H. and Kreidberg J. A. (1999) (Alpha)3(beta)1 integrin regulates epithelial cytoskeletal organization. *J Cell Sci* 112 ( Pt 17), 2925-35.
- Watanabe T., Ono Y., Taniyama Y., Hazama K., Igarashi K., Ogita K., Kikkawa U. and Nishizuka Y. (1992) Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10159-63.
- Webb D. J., Nguyen D. H. and Gonias S. L. (2000) Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion. *J Cell Sci* 113 ( Pt 1), 123-34.
- Wehrli M., Dougan S. T., Caldwell K., O'Keefe L., Schwartz S., Vaizel-Ohayon D., Schejter E., Tomlinson A. and DiNardo S. (2000) arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407, 527-30.
- Wei Y., Eble J. A., Wang Z., Kreidberg J. A. and Chapman H. A. (2001) Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1. *Mol Biol Cell* 12, 2975-86.
- Wei Y., Yang X., Liu Q., Wilkins J. A. and Chapman H. A. (1999) A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol* 144, 1285-94.
- Welch M. P., Odland G. F. and Clark R. A. (1990) Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol* 110, 133-45.
- Werb Z. and Chin J. R. (1998) Extracellular matrix remodeling during morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 857, 110-8.
- Werner S., Smola H., Liao X., Longaker M. T., Krieg T., Hofschneider P. H. and Williams L. T. (1994) The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* 266, 819-22.
- Wewer U. M., Shaw L. M., Albrechtsen R. and Mercurio A. M. (1997) The integrin alpha 6 beta 1 promotes the survival of metastatic human breast carcinoma cells in mice. *Am J Pathol* 151, 1191-8.
- Wilson J. W., Pritchard D. M., Hickman J. A. and Potten C. S. (1998) Radiation-induced p53 and p21WAF-1/CIP1 expression in the murine intestinal epithelium: apoptosis and cell cycle arrest. *Am J Pathol* 153, 899-909.
- Woessner J. F., Jr. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J* 5, 2145-54.
- Wong N. C., Mueller B. M., Barbas C. F., Ruminaki P., Quaranta V., Lin E. C. and Smith J. W. (1998) Alphav integrins mediate adhesion and migration of breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* 16, 50-61.
- Wu M. S., Huang S. P., Chang Y. T., Lin M. T., Shun C. T., Chang M. C., Wang H. P., Chen C. J. and Lin J. T. (2002) Association of the -160 C --> a promoter polymorphism of E-cadherin gene with gastric carcinoma risk. *Cancer* 94, 1443-8.
- Wyke J. A. (2000) Overview--burgeoning promise in metastasis research. *Eur J Cancer* 36, 1589-94.
- Xiang C. C., Chen M., Kozhich O. A., Phan Q. N., Inman J. M., Chen Y. and Brownstein M. J. (2003) Probe generation directly from small numbers of cells for DNA microarray studies. *Biotechniques* 34, 386-8, 390, 392-3.
- Xie D., Miller C. W., O'Kelly J., Nakachi K., Sakashita A., Said J. W., Gornbein J. and Koeffler H. P. (2001) Breast cancer. Cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. *J Biol Chem* 276, 14187-94.
- Xie D., Yin D., Tong X., O'Kelly J., Mori A., Miller C., Black K., Gui D., Said J. W. and Koeffler H. P. (2004) Cyr61 is overexpressed in gliomas and involved in integrin-linked kinase-mediated Akt and beta-catenin-TCF/Lef signaling pathways. *Cancer Res* 64, 1987-96.
- Yamamoto M., Sawaya R., Mohanam S., Rao V. H., Bruner J. M., Nicolson G. L. and Rao J. S. (1994) Expression and localization of urokinase-type plasminogen activator receptor in human gliomas. *Cancer Res* 54, 5016-20.
- Yan C., Zhu Z. G., Yu Y. Y., Ji J., Zhang Y., Ji Y. B., Yan M., Chen J., Liu B. Y., Yin H. R. and Lin Y. Z. (2004) Expression of vascular endothelial growth factor C and chemokine receptor CCR7 in gastric carcinoma and their values in predicting lymph node metastasis. *World J Gastroenterol* 10, 783-90.
- Yanagawa S., Lee J. S., Haruna T., Oda H., Uemura T., Takeichi M. and Ishimoto A. (1997) Accumulation of Armadillo induced by Wingless, Dishevelled, and dominant-negative Zeste-White 3 leads to elevated DE-cadherin in Drosophila clone 8 wing disc cells. *J Biol Chem* 272, 25243-51.
- Yang G. P., Lim I. J., Phan T. T., Lorenz H. P. and Longaker M. T. (2003) From scarless fetal wounds to keloids: molecular studies in wound healing. *Wound Repair Regen* 11, 411-8.
- Yang X., Claas C., Kraeft S. K., Chen L. B., Wang Z., Kreidberg J. A. and Hemler M. E. (2002a) Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell* 13, 767-81.
- Yang Y. H., Dudoit S., Luu P., Lin D. M., Peng V., Ngai J. and Speed T. P. (2002b) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30, e15.
- Yap A. S., Briher W. M. and Gumbiner B. M. (1997) Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 119-46.
- Yeh H. J., He Y. Y., Xu J., Hsu C. Y. and Deuel T. F. (1998) Upregulation of pleiotrophin gene expression in developing microvasculature, macrophages, and astrocytes after acute ischemic brain injury. *J Neurosci* 18, 3699-707.
- Yokoyama K., Kamata N., Hayashi E., Hoteiya T., Ueda N., Fujimoto R. and Nagayama M. (2001) Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol* 37, 65-71.
- Yonemura Y., Endo Y., Fujita H., Fushida S., Ninomiya I., Bandou E., Taniguchi K., Miwa K., Ohoyama S., Sugiyama K. and Sasaki T. (1999) Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 5, 1823-9.

## Literaturverzeichnis

---

- Yoshimasu T., Sakurai T., Oura S., Hirai I., Tanino H., Kokawa Y., Naito Y., Okamura Y., Ota I., Tani N. and Matsuura N. (2004) Increased expression of integrin alpha3beta1 in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci* 95, 142-8.
- Yu J., Othman M. I., Farjo R., Zarepari S., MacNee S. P., Yoshida S. and Swaroop A. (2002) Evaluation and optimization of procedures for target labeling and hybridization of cDNA microarrays. *Mol Vis* 8, 130-7.
- Zawel L., Dai J. L., Buckhaults P., Zhou S., Kinzler K. W., Vogelstein B. and Kern S. E. (1998) Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1, 611-7.
- Zervos A. S., Gyuris J. and Brent R. (1994) Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 79, following 388.
- Zhai Y., Wu R., Schwartz D. R., Darrah D., Reed H., Kolligs F. T., Nieman M. T., Fearon E. R. and Cho K. R. (2002) Role of beta-catenin/T-cell factor-regulated genes in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Am J Pathol* 160, 1229-38.
- Zhang F., Tom C. C., Kugler M. C., Ching T. T., Kreidberg J. A., Wei Y. and Chapman H. A. (2003) Distinct ligand binding sites in integrin alpha3beta1 regulate matrix adhesion and cell-cell contact. *J Cell Biol* 163, 177-88.
- Zhang X. A., Bontrager A. L. and Hemler M. E. (2001) Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem* 276, 25005-13.
- Zhou Q., Sherwin R. P., Parrish C., Richters V., Groshen S. G., Tsao-Wei D. and Markland F. S. (2000) Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat* 61, 249-60.
- Zhou Y., Gwadry F. G., Reinhold W. C., Miller L. D., Smith L. H., Scherf U., Liu E. T., Kohn K. W., Pommier Y. and Weinstein J. N. (2002) Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects. *Cancer Res* 62, 1688-95.
- Ziauddin J. and Sabatini D. M. (2001) Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature* 411, 107-10.

# H ABKÜRZUNGEN

## 1. Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien und Enzyme

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium Ion
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
d.h.	das heißt
cDNA	Komplementäre DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluoreszein
E.coli	Escherichia coli
ED	Extrazelluläre Domäne
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT:	Epithelial-mesenchymal cell transformation
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
FCS	Fötales Kälberserum
Fw	Vorwärtsprimer
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H. pylori	Helicobacter pylori
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Destilliertes Wasser
HEPES	N-2-Hydroxymethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase
IMAGE	Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression
IPTG	Isopropyl-thiogalacto-pyranoside
MCS	multiple cloning site
MDA	MDA-MB-435S
MDA D257A	MDA-MB-435S transfiziert mit E-Cadherin (Punkmutation in D257A)
MDA D370A	MDA-MB-435S transfiziert mit E-Cadherin (Punkmutation in D370A)
MDA D479A	MDA-MB-435S transfiziert mit E-Cadherin (Punkmutation in D479A)
MDA D590A	MDA-MB-435S transfiziert mit E-Cadherin (Punkmutation in D590A)
MDA D8	MDA-MB-435S transfiziert mit E-Cadherin (Exon 8 Deletion)
MDA D9	MDA-MB-435S transfiziert mit E-Cadherin (Exon 9 Deletion)
MDA E273A	MDA-MB-435S transfiziert mit E-Cadherin (Punkmutation in E273A)
MDA WT	MDA-MB-435S transfiziert mit E-Cadherin (Wildtyp)
mg	Miligramm
ml	Mililiter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA (Boten RNA)

## Abkürzungen

---

n.a.	nicht annotiert
ng	Nanogram
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p.a.	per annum
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Rückwärtsprimer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
Rw	Reverserprimer
RZPD	Deutsches Ressourcen-Zentrum für Genomforschung GmbH
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Single Nukleotide Polymorphismus
siRNA	short interfering RNA
s.u.	siehe unten
TBP	TATA box-binding protein
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
µl	Mikroliter
Uni	Universal Primer
v/v	Volumen / Volumen
VP	Vorwärtsprimer
w/v	Gewicht / Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 2. Abkürzungen von Gennamen

APC	adenomatous polyposis coli
ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
AXIN2	axin 2 (conductin, axil)
CSF1	colony-stimulating factor 1
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
DSH	Dishevelled
E12/E47	transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
FRZB	frizzled-related protein
FZD7	frizzled homolog 7 (Drosophila)
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSK-3β	glycogen synthase kinase
IGF1	insulinlikegrowth factor I
ITGA3	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
LAMA4	laminin, alpha 4
LEF	lymphoid-enhancer factor
MCP1	monocyte chemoattractant protein 1
MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)
MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)

## Abkürzungen

---

MMP8	matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)
MXI1	MAX interacting protein 1
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
PDGF	platelet-derived growth factor
PTN	pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)
SIP1	survival of motor neuron protein interacting protein 1
SNAI2	snail homolog 2 (Drosophila)
SNAIL1	snail homolog 1 (Drosophila)
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
TCF	T cell factor
TGF $\alpha$	transforming growth factor alpha
TGF $\beta$	transforming growth factor beta
TGFBR3	transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300kDa)
TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)
TWIST	twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (Drosophila)
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFC	vascular endothelial growth factor C
WNT	Wingless
ZEB1	transcription factor 8 (represses interleukin 2 expression)

Eine komplette Liste aller Gennamenabkürzungen, Gennamen, Referenzsequenzen und Chromosomenlokalisationen des hier verwendeten Mikroarrays ist unter folgender Webadresse zu finden:

<http://telepath.gsf.de/pathol/arrays.html>

# I PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

## Publikationen

- 2006 **Laux H**, Tomer R, Smida J, Blöchinger M, Schütze N, Sagan D, Schnitzbauer U, Eckardt-Schupp F, Höfler H, Becker KF:  
**E-cadherin effects the expression of wound healing genes in cancer cells**  
(in preparation)
- 2004 **Laux H**, Tomer R, Mader MT, Smida J, Budczies J, Kappler R, Hahn H, Blöchinger M, Schnitzbauer U, Eckardt-Schupp F, Höfler H, Becker KF:  
**Tumor associated E-cadherin mutations do not induce Wnt target gene expression, but affect E-cadherin repressors.**  
Laboratory Investigation 2004 Oct;84(10):1372-86
- 2002 Pharoah PD, Oliveira C, Machado JC, Keller G, Vogelsang H, **Laux H**, Becker KF, Hahn H, Paproski SM, Brown LA, Caldas C, Huntsman D.:  
**CDH1 c-160a promotor polymorphism is not associated with risk of stomach cancer.**  
Int J Cancer. 2002 Sep 10;101(2):196-7

## Vorträge

- 2004 **Graduated School Biology of Human Diseases, Munich, Germany**  
**H. Laux**, K.-F. Becker:  
cDNA microarray analysis of cancer cells expressing E-cadherin variants: towards a functional understanding of altered cell adhesion
- 2003 **87th Conference of the German Association of Pathology, Bamberg, Germany**  
**H. Laux**, R. Kappler, H. Hahn, H. Höfler, K.-F. Becker:  
E-cadherin-abhängige Genexpressionsdifferenzen in Tumorzellen, nachgewiesen mittels der cDNA-Microarray-Technologie
- 2002 **Graduated School Biology of Human Diseases, Munich, Germany**  
**H. Laux**, K.-F. Becker:  
Genexpressions Analysis in Tumor cells using cDNA-Array

Poster

- 2004**     **18th Annual Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR), Innsbruck, Austria**  
**H. Laux**, R. Tomer, M. Blöchinger, H. Höfler, K.-F. Becker  
E-Cadherin mutations effect the expression of wound healing genes
- 2003**     **94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), Washington, United States of America**  
**H. Laux**, M. Mader, J. Budczies, R. Kappler, H. Hahn, M. Blöchinger, U. Schnitzbauer, H. Höfler, K.-F. Becker  
E-cadherin defects activate a genetic program for tumor metastasis determined by cDNA microarray analysis
- 2003**     **Genomics and Cancer, Heidelberg, Germany**  
**H. Laux**, M. Mader, J. Budczies, R. Kappler, H. Hahn, M. Blöchinger, U. Schnitzbauer, H. Höfler, K.-F. Becker  
Upregulation of metastasis promoting genes depending on E-cadherin defects determined by c-DNA microarrays
- 2003**     **Rekombinationsmeeting, Munich**  
D. Sagan, G. A. Drexler, F. Eckardt-Schupp, H. Eichholtz, **H. Laux**, S. Mörtl, J. Smida  
Development of a cDNA Microarray for the Analysis of differentially expressed Genes involved in DNA Double Strand Break Repair

# Curriculum Vitae



## Persönliche Informationen

- Name: Holger Laux
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geb.: 26.01.1973 in München

## Berufserfahrung

- Seit 2005                      Wissenschaftler bei LGC, London
- 2000 - 2004                    Institut für Pathologie, GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit), Neuherberg
- Promotion mit dem Thema:  
„Genexpressionsanalysen in Tumorzellen mittels cDNA Mikroarray-Technologie“
- 1998 - 1999                    Max von Pettenkofer-Institut, München
- Diplomarbeit mit dem Thema:  
„Expression von Oberflächenproteinen bei *Borrelia burgdorferi*“
  - Diplomarbeitenote: 1,3

## Ausbildung

- 1993 - 1998                    Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Vertiefungsfächer: Infektionsbiologie, Genetik, Mikrobiologie, Immunologie und Biochemie
  - Diplom, Note 1,5
- 1984 - 1993                    Erasmus Grasser Gymnasium (naturwissenschaftlicher Zweig), München
- Abitur, Note: 2,0

## Praktika

- 2000 – 2000                    University of Minnesota, St. Paul, USA
- Untersuchung der Adhäsion und Invasion von Humane granulozytäre Ehrlichiose
- 1997 – 1997                    Immunologisches Institut München
- Sequenzierung des HLA A Lokus
- 1996 – 1996                    Max-Planck-Institut für Biochemie, München
- Untersuchungen von Bakteriorhodopsin aus Halobakterium salinarium
- 1996 – 1996                    Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
- Elektrophysiologische Untersuchungen an kanalbildenden Porinen

## Vorlesungen

- 1997 – 2002                    Institut für Genetik und Mikrobiologie LMU, München
- 6 x Wissenschaftliche Betreuung des Genetikpraktikums für Medizinstudenten

## Weiterbildung

- 2000 - 2004                    Institut Student und Arbeitsmarkt LMU, München
- Grundkurs betriebswirtschaftliches Wissen, EDV Office-Paket Marketing/Vertrieb, Projektmanagement, Excel, Business English

## Qualifikationen

Zellkultur, Western-, Northern- and Southernblot, Microarray, quantitative real time RT-PCR, Sequenzierung, Transfektion, PCR, IFT (Immunfluoreszenstest), Klonierung, RNA Isolierung, FACS

## EDV-Kenntnisse

Windows, Office, Corel Draw, Photoshop, Endnote, Array Pro, Imagen, Vector NTI

## Sprachkenntnisse

Englisch: in Wort und Schrift, Latein (Schulkenntnisse)

## Interessen

Wirtschaft, Politik, Mountainbiken, Computer, Photographie

# Erklärung

Diese Arbeit wurde am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GSF, Neuherberg, im Institut für Pathologie sowie an der Technischen Universität München im Institut für Pathologie unter der Leitung von Herrn Dr. habil. K.-F. Becker angefertigt.

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

London, den 28.10.2006

---

Holger Laux