

Der Adhäsions-GPCR CD97/ADGRE5 interagiert in *adherens junctions* mit β -catenin

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Norman Dietrich

Geburtsdatum / Geburtsort:

26.07.1985 / Leipzig

angefertigt in:

**Universität Leipzig
Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Forschungslabore**

**Liebigstraße 19,
04103 Leipzig**

Betreuerin:

Prof. rer. nat. Gabriela Aust

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

14.11.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	2
2. Einleitung	3
2.1 Aufbau von epithelialen Zellkontakten	3
2.2 Proteine in epithelialen Zellkontakten und ihre Rolle bei der Karzinogenese	4
2.3 β -catenin und Wnt-Signalweg	7
2.4 Kolorektales Karzinom	9
2.5 CD97/ADGRE5	10
3. Ziele	13
4. Materialien und Methoden	14
4.1 Ethikantrag	14
4.2 Antikörper für Immunhistochemie	14
4.3 Patientenkollektiv	15
4.4 Immunhistochemische Färbemethode	17
4.5 Immunfluoreszenzfärbung	18
4.6 Zelllinien und WesternBlot	18
4.7 Histologische Auswertung und Scoring	19
4.8 Statistik	19
5. Ergebnisse	20
5.1 Neue immunhistochemische Färbemethode zur Darstellung von CD97	20
5.1.1 Austesten der Antikörper in der enzymatischen Immunhistochemie	20
5.1.2 Austesten der Antikörper in der Immunfluoreszenz	20
5.1.3 Ergebnisse der Austestung der CD97 Antikörper	20
5.2 Expression von CD97 und β -catenin im kolorektalem Normalgewebe	28
5.3 Expression von CD97 und β -catenin im kolorektalem Karzinom	32
5.3.1 Kolokalisation von CD97 und β -catenin	32
5.3.2 Expression von CD97 und β -catenin in <i>scattered</i> Tumorzellen	34
5.4 Lokalisation von CD97 und β -catenin in der kolorektalen Tumorgenese	35
5.5 Expression von CD97 und β -catenin und klinische Parameter	37
6. Diskussion	49
6.1 Neue immunhistochemische Färbemethode und Auswahl der Antikörper	49
6.2 Nachweis von CD97 in Kryostat- und Paraffin-eingebetteten Geweben	49
6.3 Lokalisation von CD97 und β -catenin im kolorektalem Karzinom	50
7. Zusammenfassung	53
8. Literaturverzeichnis	56
9. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	65
10. Lebenslauf	66
11. Publikationen	68
12. Danksagung	69

1. Abkürzungsverzeichnis

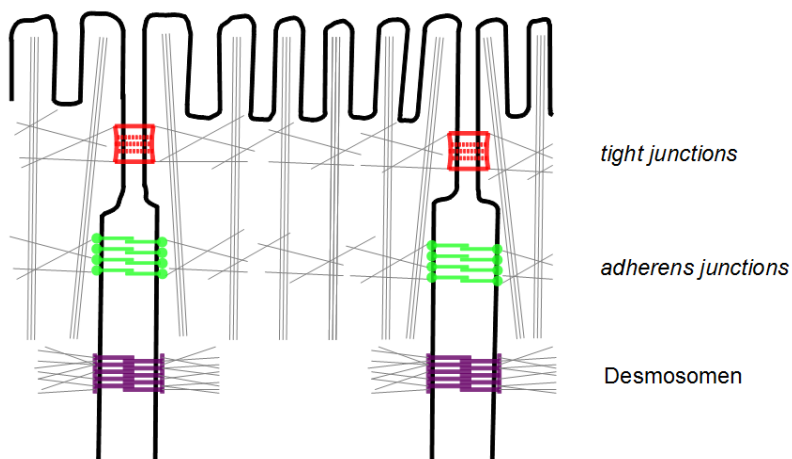
aa	<i>amino acids</i>
Abb.	Abbildung
AJ	<i>adherens junctions</i>
AK	Antikörper
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ARVCF	<i>armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome</i>
β -cat	β -catenin
β TrCP	<i>β-Transducin repeat-containing protein</i>
CC	kolorektales Karzinom
CTF	C-terminales Fragment
DSS	<i>dextran sodium sulfate</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
GAIN	<i>GPCR-Autoproteolysis INducing</i>
GPCR	G protein-coupled receptor
GPS	GPCR proteolysis site
GSK3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
IF	Immunfluoreszenzfärbung
IHC	Immunhistochemische Färbung
LRP6	<i>Low-density lipoprotein receptor related protein 6</i>
MET	Mesenchymale-Epitheliale Transition
MT1-MMP	<i>membrane type-1 matrix metalloproteinase</i>
NTF	N-terminales Fragment
SCF-Komplex	<i>Skp, Cullin, F-box containing</i> Komplex
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Slimb	<i>Supernumerary limbs</i>
Tab.	Tabelle
Tcf/Lef	<i>T-cell factor/Lymphoid enhancer factor</i>
TJ	<i>tight junctions</i>
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor
WB	Western Blot
Wnt	<i>Wingless/Int-1</i>

2. Einleitung

2.1 Aufbau von epithelialen Zellkontakten

In Zellverbänden werden epitheliale Zellen durch laterale Zellkontakte zusammengehalten. Sie dienen der Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität im Zellverband, sowie der Sicherstellung des parazellulären Transports und von Signaltransduktionsmechanismen. Zu den lateralen Zellkontakten gehören *tight junctions* (TJ, oder Zonula occludens), *adherens junctions* (AJ, oder Zonula adherens) und Desmosomen. Der grundsätzliche Aufbau dieser lateralen Zellkontakte ist gleichartig (Abb. 1). Der Interzellularraum wird durch transmembranäre Moleküle, die mittels verschiedener Proteine an das Zytoskelett verankert werden, überbrückt.

A



B

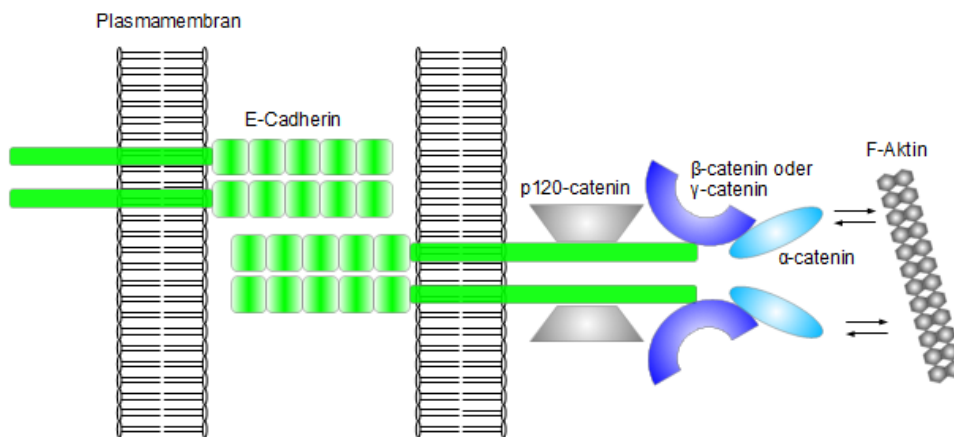


Abbildung 1: Aufbau lateraler Zellkontakte am Beispiel von AJ

A. Schematische Darstellung der lateralen Zellkontakte benachbarter intestinaler Epithelzellen. Die TJ (rot) bilden die am weitesten apikal gelegenen lateralen Zellkontakte aus, gefolgt von den AJ (grün). TJ und AJ bestehen aus transmembranären Proteinen, die über intrazelluläre Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind. Desmosomen (lila) sind wie die AJ ebenfalls basal der TJ gelegen und dienen der Verbindung mit Intermediärfilamenten. B. AJ werden mittels der homophilen Interaktion des transmembranären Proteins E-Cadherin gebildet. Verschiedene intrazelluläre Proteine (p120-catenin, β -catenin, γ -catenin, α -catenin) stellen die Verbindung von E-Cadherin mit dem Aktin-Zytoskelett her. Neben den auf E-Cadherin/ β -catenin-basierten AJ gibt es eine zweite Form der AJ, die auf der Interaktion von Nectin und Afadin basiert. In der vorliegenden Arbeit werden nur die AJ auf E-Cadherin/ β -catenin-Basis betrachtet. [Abbildung adaptiert von [1] und [2]]

2.2 Proteine in epithelialen Zellkontakten und ihre Rolle bei der Karzinogenese

Während der Tumorgenese werden diese Zell-Zell-Verbindungen in ihrer Struktur verändert und/oder abgebaut. Ein entscheidender Mechanismus bei diesem Vorgang ist das Verschwinden bzw. die Translokation der an dem Aufbau dieser Zellkontakte beteiligten Proteine in das Zytoplasma oder den Zellkern. Diese Translokation kann mit Funktionsänderungen der Verbindungsproteine einhergehen (Tab. 1). Dabei kommt es zu neuen molekularen Interaktionen, die u.a. wichtige Prozesse während der Karzinogenese regulieren. Bei der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) kommt es zur De-Differenzierung von epithelialen Zellen. Der Verlust des membranären E-Cadherins von AJ und die Assoziation mit der nukleären Akkumulation von β -catenin sind Kennzeichen der EMT. EMT ermöglicht es Karzinomzellen invasiv in das umgebende Gewebe vorzudringen und führt somit zur Tumorprogression [3, 4].

In Tab. 1 sind Proteine zusammengefasst, die in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation in lateralen Zellkontakten oder im Zytoplasma bzw. Zellkern unterschiedliche Funktionen haben.

Tabelle 1: Proteintranslokation von lateralen Zellkontakten in Zytoplasma und Zellkern

Protein	Lokalisation	Funktion	Translokation	„neue“ Funktion	Literatur
E-Cadherin	AJ	Transmembranärer Rezeptor, verankert durch homophile Interaktion benachbarte Zellen miteinander	Keine Translokation, aber Verlust	Verlust von E-Cadherin induziert Transkriptionsfaktoren, Induktion von EMT	[3, 5, 6]
β -catenin	AJ	Verbindet E-Cadherin mit Aktin	Zellkern, Zytoplasma	Bindet an Tcf/Lef und wirkt als Transkriptionsaktivator im Wnt-Signalweg, assoziiert mit Induktion von EMT	[3, 7, 8, 9, 10, 11, 12]
p120-catenin	AJ	Interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin (juxtamembranäre Region)	Zellkern, Zytoplasma	Transkriptionskontrolle durch Bindung an Kaiso, p120-Zytoplasmapool beeinflusst Zellmigration über Regulation von Rho-GTPasen	[13, 14, 15, 16]
α -catenin	AJ	Verbindet den Cadherin-Catenin-Komplex mit dem Aktin-Zytoskelett	Zellkern, Zytoplasma	Tumor-Suppressor, Funktion durch Interaktion mit Transkriptions-Koaktivator Yap1	[17, 18, 19, 20]
Ajuba	AJ	Interaktion mit α -catenin in AJ	Zellkern	Wachstumshemmung und Induktion der Differenzierung von embryonalen Karzinomzellen durch Aktivierung der c-Jun Kinase	[21, 22]
Zyxin	AJ	Interaktion mit α -actinin	Zellkern	unbekannt	[23]

ARVCF	AJ	Assoziation mit E-Cadherin	Zellkern	unbekannt	[24]
p0071 (Plakophilin-4, PKP4)	AJ, Desmosom	Plaque-Protein in AJ	Zellkern, Zentromer und Spindelkörper in mitotischen Zellen, <i>midbody</i> während Zytokinese	Erforderlich für Zellteilung, Regulation von Rho bei Zytokinese	[25, 26, 27]
Plakophilin1 (PKP1)	Desmosom	Essentieller Bestandteil der desmosomalen Plaques, Verlust führt zu Instabilität von Desmosomen	Zellkern, Zytoplasma (in sogenannten <i>stress granules</i> , in Zellen die schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt sind)	reguliert Translation und Proliferation über die Modulation des Translations-Initiationsfaktors 4A1 (eIF4A1), PKP1 schützt Zellen evtl. vor DNA-Schäden	[28, 29, 30, 31, 32]
Plakophilin2 (PKP2)	Desmosom	Essentieller Bestandteil der desmosomalen Plaques	Zellkern	Assoziation mit nukleärer RNA Polymerase III, upreguliert die endogene β -catenin/Tcf-Signalaktivität	[33, 34, 35]
Desmocollin-2 (Dsc2)	Desmosom	Transmembranäres Glykoprotein, Zelladhäsion durch Verankerung mit Intermediärfilamenten	Keine Translokation, aber Expression \downarrow bei gleichzeitiger Expression \uparrow von Dsc1 und Dsc3	Verlust von Dsc2 fördert Zellproliferation, führt zu Tumorwachstum durch Akt/ β -catenin-Signal-Aktivierung	[36, 37, 38]
Plakoglobin (γ -catenin)	AJ, Desmosom	Interagiert mit Desmoglein und Desmocollin in Desmosomen, Verbindet E-cadherin via α -catenin mit dem Aktin-Zytoskelett in AJ	Zellkern, Zytoplasma	Bindet an Tcf/Lef und wirkt als Transkriptionsaktivator, Onkogen (aktiviert c-myc) bei deregulierter Expression	[39, 40, 41]
Par-3 (<i>partitioning defective-3</i>)	TJ	Zellpolarisation und Aufbau von TJ	Zellkern	Durch Komplexbildung mit Ku70/Ku80 Regulation der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	[42, 43, 44]
ZO-1 (<i>zonula occludens protein-1</i>)	TJ	Mitglied der MAGUK-Proteinfamilie mit Struktur- und Signalfunktion	Zellkern (kontrovers diskutiert)	Regulation der Lokalisation von Transkriptionsfaktoren wie ZONAB/DbpA und AP-1 und anderen Proteinen, die die Genexpression kontrollieren	[45, 46]

ZO-2 (<i>zonula occludens protein-2</i>)	TJ	Mitglied der MAGUK-Proteinfamilie mit Struktur- und Signalfunktion	Zellkern	Regulation der Lokalisation von Transkriptionsfaktoren wie ZONAB/DbpA und AP-1 und anderen Proteinen, die die Genexpression kontrollieren, Cyclin-D1-Transkription↓ via Ebox und c-myc, inhibiert Zellzyklus und Zellproliferation	[45, 46, 47, 48]
ZONAB (<i>ZO-1 associated nucleic acid-binding protein</i>)	TJ	Interaktion mit ZO-1 in TJ	Zellkern	reguliert die Expression des Proto-Onkogens erbB-2, Assoziation mit CDK4, ZONAB↑ → Zelldichte↑, reguliert zusammen mit GEF-H1 Rho-vermittelte Cyclin D1-Promotoraktivität und –expression, inhibiert zusammen mit Symplekin die intestinale Zelldifferenzierung	[49, 50, 51, 52]
Tricellulin (<i>marvelD2</i>)	TJ	Essentieller Bestandteil von TJ in trizellulären Kontakten	Zellkern	Expression im Zellkern und perinukleär, Funktion unklar	[53, 54]
Symplekin	TJ		Zellkern	Beteiligt an mRNA-Prozessierung, interagiert mit Polyadenylierungskomplex	[55, 56, 57]
huASH1 (<i>human absent, small, or homeotic 1</i>)	TJ		Zellkern	Transkriptionsfaktor der Trithorax-Gruppe, Histonmethyltransferase (wie Drosophila-Analogon ASH1)	[58, 59]
CDK4 (<i>cyclin-dependent Kinase 4</i>)	TJ	Bindet an ZONAB	Zellkern	G1/S-Phase Transition	[60]
MAGI-1 (<i>membrane-associated guanylate kinase-1</i>)	TJ		Zellkern	unbekannt	[61]

Abk.: ↑ = Verstärkung, ↓ = Verminderung

2.3 β -catenin und Wnt-Signalweg

β -catenin ist ein Protein, das je nachdem, in welchem Zellkompartiment (laterale Zell-Zellkontakte bzw. Zytoplasma/Zellkern) es lokalisiert ist, unterschiedliche Funktionen hat (Tab. 1). In AJ verbindet β -catenin E-Cadherin mit dem Aktin-Zytoskelett und stabilisiert so den Epithelzellverband (Abb. 1B) [7]. Die zelluläre Verteilung von β -catenin wird u.a. über den kanonischen Wnt-Signalweg reguliert [12]. Bei Inaktivität des Wnt-Signalweges kommt es zur Phosphorylierung von β -catenin, das in einem Multiprotein-Komplex gebunden ist. Dieser Komplex besteht aus Axin1/Conductin, Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) und *adenomatous polyposis coli* (APC) [62, 63, 64, 65, 66]. GSK3 β phosphoryliert Serin- und Threoninreste von β -catenin [67, 68]. Diese Phosphorylierung markiert β -catenin für die Ubiquitinierung durch den SCF-Komplex, bestehend aus dem F Box Protein β TrCP/Slimb [69, 70]. Anschließend erfolgt der Abbau von β -catenin im Proteasom (Abb. 2A) [68].

Bei Aktivierung des Wnt-Signalweges wird das zytoplasmatische Protein *Dishevelled* an die Zellmembran rekrutiert [71, 72]. *Dishevelled* hemmt dann durch direkte Bindung Axin1 [66, 73]. Axin1 bildet eine Art Gerüst im β -catenin Multiprotein-Komplex, indem es an APC, GSK3 β und β -catenin bindet [67]. Bei einer Inhibition von Axin1 wird β -catenin nicht phosphoryliert und im Zytoplasma stabilisiert. Es kommt zur Akkumulation von β -catenin im Zytoplasma und zur Translokation in den Zellkern [8]. Im Zellkern bindet β -catenin als Ko-Aktivator an Tcf/Lef Transkriptionsfaktoren und führt dadurch zur Aktivierung von Genen, die Proteine kodieren, welche u.a. die kolorektale Karzinogenese stimulieren (Abb. 2B) [9, 10, 11]. Die nukleäre Akkumulation kann man immunhistochemisch im Paraffinschnitt von kolorektalen Tumoren darstellen [74, 75].

Die oben beschriebene Aktivierung des Wnt-Signalweges erfolgt durch lösliche Wnt-Liganden und spielt u. a. eine entscheidende Rolle bei der Stammzellformation [76, 77, 78]. Der Wnt-Signalweg spielt auch für die intestinale Entwicklung eine essentielle Rolle. Aktiviertes (nukleäres) β -catenin fördert den Übergang von ruhenden intestinalen Stammzellen in proliferierende sich weiter-differenzierende Tochterzellen [79]. Ein entscheidender Prozess dabei ist die Mesenchymale-Epitheliale Transition (MET), d.h. der Übergang von einem mesenchymalen in einen epithelialen Phänotyp. MET und der umgekehrte Prozess der EMT sind wesentliche Prozesse bei der Embryo- und Gewebsmorphogenese, wie z.B. der Gastrulation [80].

Kommt es zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges, kann es auch in Tumorzellen zu einer Induktion von EMT kommen [81, 82, 83, 84]. Der Verlust des membranären E-Cadherins von AJ ist ein wesentliches Kennzeichen der EMT. Parakrine Signale aus der Tumorumgebung können, z.B. durch die Regulation der intrazellulären Verteilung von β -catenin, die EMT direkt und indirekt induzieren [85]. Die Translokation von β -catenin von den AJ in den Nukleus kann indirekt den Verlust des membranären E-Cadherins fördern und infolgedessen auch die EMT triggern [3]. Zudem kann nukleäres β -catenin EMT-assoziierte Zielgene, wie z.B. den E-Cadherin-Gen-Repressor *slug* [86], direkt aktivieren.

Die Mehrheit der sporadischen kolorektalen Karzinome zeigen eine inaktivierende Mutation des APC-Genes [87] (Abb. 2C). Der Verlust der Funktion von APC führt zur intrazellulären Stabilisierung von β -catenin. In selteneren Fällen sind im kolorektalen Karzinom onkogene Mutationen von β -catenin zu finden [88] (Abb. 2D). Diese Mutationen führen zu einer Resistenz von β -catenin gegenüber dem Abbau im Proteasom und somit zu seiner intrazellulären Stabilisierung. In beiden Fällen wird β -catenin in den Nukleus transloziert und es erfolgt die Aktivierung der Zielgene des Wnt-Signalweges [11] (Abb. 3).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die intrazelluläre Verteilung von β -catenin u.a. über den kanonischen Wnt-Signalweg reguliert wird [12]. Eine Dysregulation dieses Wnt-Signalweges führt zur intrazellulären Stabilisierung von β -catenin und fördert die Progression der kolorektalen Karzinogenese.

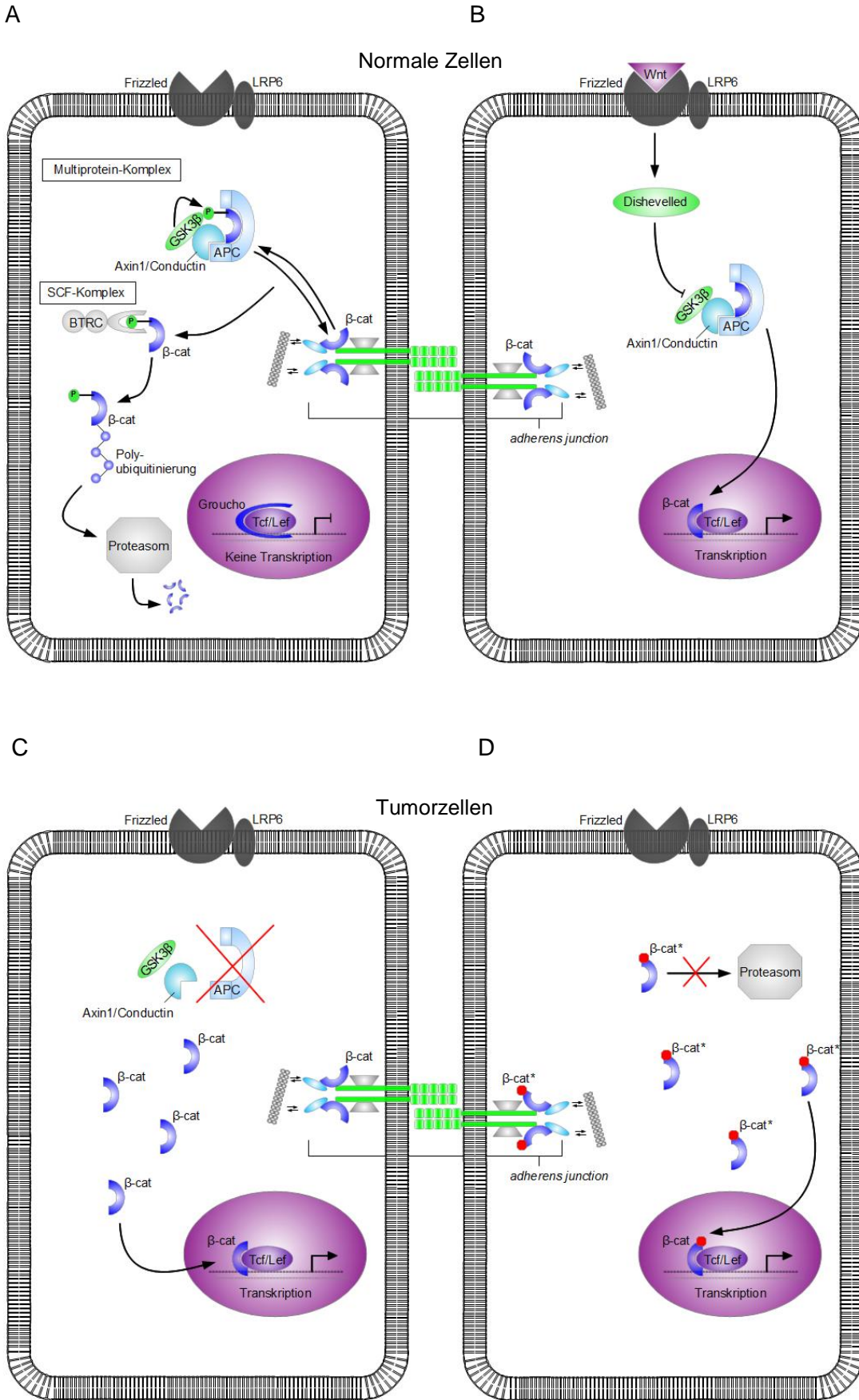


Abbildung 2: Wnt-Signalweg

A. In einer normalen Epithelzelle ist β -catenin ein Bestandteil der AJ. Bei Inaktivität des Wnt-Signalweges ist der zytosolische Multiprotein-Komplex aktiv. β -catenin wird im Zytoplasma phosphoryliert und somit über eine Polyubiquitinierung markiert, um im Proteasom abgebaut zu werden. β -catenin wird nicht in den Zellkern transloziert

und es kommt nicht zur Aktivierung von Tcf/Lef Zielgenen. In Abwesenheit des aktivierenden Wnt-Signals kommt es zu einer Repression dieser Zielgene durch die Assoziation von Tcf/Lef-Proteinen und dem Ko-Repressor Groucho.

B. Kommt es zur Bindung von löslichen Wnt-Liganden an die Ko-Rezeptoren Frizzled und LRP6, wird der Multiprotein-Komplex durch *Dishevelled* inaktiviert. Es kommt zu einer Stabilisierung und Akkumulation von nicht-phosphoryliertem β -catenin im Zytoplasma. Infolgedessen transloziert β -catenin in den Zellkern und aktiviert die Transkription von Tcf/Lef Zielgenen. Dies ist der physiologische Weg der Aktivierung des Wnt-Signalweges wie es z.B. bei der Stammzellformation und der EMT in der Embryogenese der Fall ist.

C. In Tumorzellen kommt es zu einer inaktivierenden Mutation von APC. Dadurch wird der intrazelluläre Abbau von β -catenin verhindert. β -catenin akkumuliert im Zytoplasma und wird in den Nucleus transloziert. Im Nucleus aktiviert β -catenin die Transkription von Tcf/Lef Zielgenen. Diese Aktivierung des Wnt-Signalweges tritt bei der Mehrzahl der sporadischen kolorektalen Karzinome auf.

D. Seltener kommt es durch eine direkte Mutation von β -catenin zur Aktivierung des Wnt-Signalweges. Durch diese Mutation ist β -catenin resistent gegenüber dem eigenem proteasomalem Abbau. Daraufhin kommt es ebenfalls zu einer zytoplasmatischen Akkumulation mit nachfolgender nukleärer Translokation von β -catenin. BTRC= β TrCP; Phosphorylierung (P) [89]. [Abbildung adaptiert nach [87]].

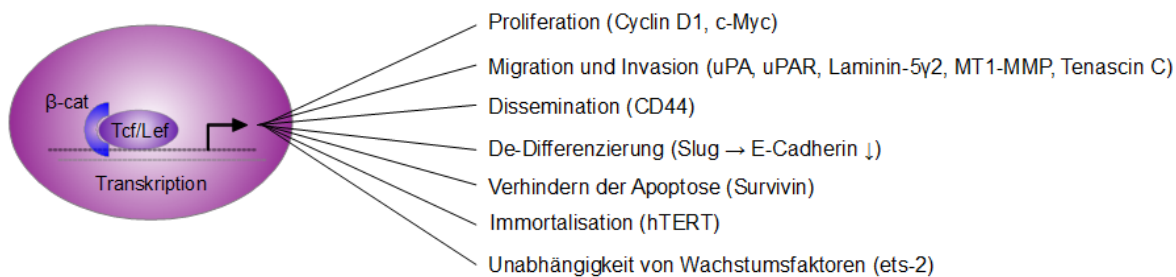


Abbildung 3: Zielgene des Wnt-Signalweges

Einige Zielgene des Wnt-Signalweges kodieren für Proteine, die für die Entwicklung und Progression von kolorektalen Karzinomen notwendig sind [90]. Nukleäres β -catenin aktiviert Gene, die die Proliferation (c-Myc [91]; Cyclin D1 [92]), Migration und Invasion (uPA [93]; uPAR [94]; Laminin-5y2 [95]; MT1-MMP [96]; Tenascin C [97]), Dissemination (CD44 [98]), De-Differenzierung (Down-Regulation (\downarrow) von E-Cadherin durch Slug [99, 86]), Umgehung der Apoptose (Survivin [100, 101] und Immortalisation (hTERT) [102]), sowie die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren (ets-2 [103]) vorantreiben. [Abbildung adaptiert nach [104]].

2.4 Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Normalgewebe ist aus Krypten aufgebaut. Die Krypte ist ein proliferatives Kompartiment, das sich aus intestinalen Stammzellen regeneriert [105, 106]. Aus ihnen leiten sich proliferierende Progenitorzellen ab, die entlang der Krypt-Villus Achse aufsteigen. Im Verlauf differenzieren sich diese Progenitorzellen zu Enterozyten, Becherzellen, die schützende Muzine sezernieren, enteroendokrinen Zellen, die wiederum Hormone, wie z.B. Serotonin und Sekretin, produzieren sowie Paneth-Zellen, die antimikrobielle Peptide bilden [105, 107]. Um den ständigen Zellnachschub zu kompensieren, kommt es zur Apoptose der differenzierten Zellen und der Ausstoßung dieser ins Darmlumen [108]. Diese Homöostase der intestinalen Selbsterneuerung, d.h. das Zusammenspiel von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose, unterliegt einer strengen Kontrolle und Regelung. Der Wnt-Signalweg spielt bei dieser Kontrolle und Regulation eine entscheidende Rolle. Dabei besteht die Hauptaufgabe des Wnt-Signalweges darin, eine Homöostase der Stammzellproliferation und somit die physiologische intestinale Selbsterneuerung aufrechtzuerhalten. Eine Dysregulation des Wnt-Signalweges in kolorektalen Zellen stört somit dramatisch diese Homöostase im intestinalen Epithel. Es kommt zu unkontrollierter

Hyperproliferation von intestinalen Zellen [106]. Somit ist zu erklären, dass ein fehlregulierter Wnt-Signalweg ein zeitlich früh auftretendes und häufiges Merkmal bei der Entstehung kolorektaler Karzinome ist [12].

Etwa 30% der kolorektalen Karzinome sind erblich bedingt [109]. Beispiele hierfür sind die *familial adenomatous polyposis* (FAP) und das HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*). Etwa 70% der kolorektalen Karzinome entstehen sporadisch. Bei der Entstehung kolorektaler Karzinome werden verschiedene Malignitätsstadien durchlaufen. Jedes dieser Malignitätsstadien zeigt dabei typische genetische Veränderungen [110]. Dies führt zu dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz (Abb. 4). Es beinhaltet, dass (a) kolorektale Karzinome dadurch entstehen, dass es zu aktivierenden Mutationen von Onkogenen bei gleichzeitiger Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen kommt; (b) Mutationen in mehreren Genen notwendig sind, um maligne Tumore zu entwickeln; und (c) die genetischen Veränderungen in einer bevorzugten Reihenfolge auftreten, aber die biologischen Eigenschaften des Tumors vielmehr durch die Summe der genetischen Veränderungen bestimmt werden [111]. In Abbildung 4 ist das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz schematisch dargestellt.

Die Läsionen, die zuerst auftreten, sind die sogenannten *aberrant crypt foci* (ACF), gefolgt von Adenomen. Diese können sich schließlich weiter in Adenokarzinome entwickeln [111]. Die früheste genetische Veränderung in der kolorektalen Karzinogenese ist eine inaktivierende Mutation im APC-Gen [112]. Sowohl bei der erblich bedingten FAP, als auch bei etwa 85% der sporadisch entstandenen kolorektalen Karzinome sind solche Mutationen im APC-Gen nachzuweisen [113] (Abb. 2C). Eine onkogene Mutation im Gen, das für β -catenin kodiert, ist in ca. 10% der sporadischen kolorektalen Karzinomfälle zu finden [113] (Abb. 2D). Beide Mutationen führen zur intrazellulären Stabilisierung und nukleären Translokation von β -catenin. Jede Mutation, die zu stabilisiertem nukleärem β -catenin führt, reicht aus, um eine maligne Transformation von kolorektalem Epithelgewebe zu triggern [114].

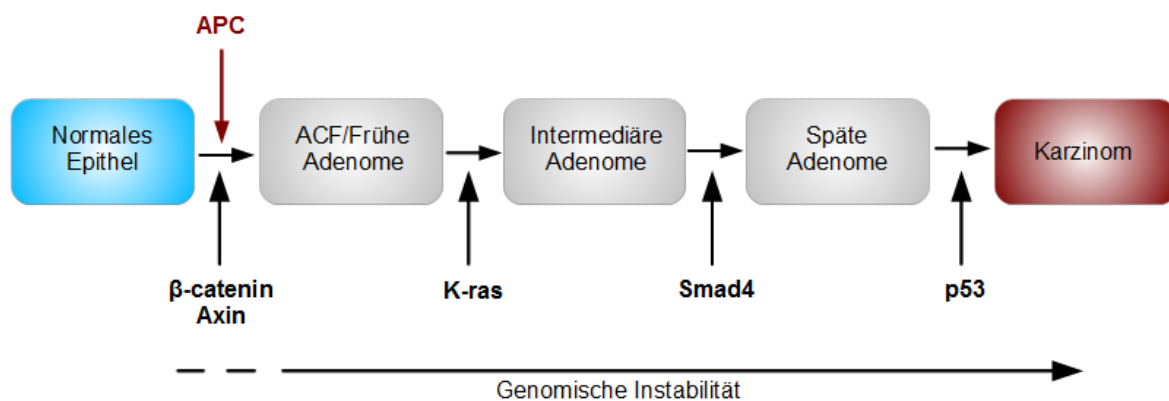


Abbildung 4: Adenom-Karzinom-Sequenz

Genetisches Modell der humanen kolorektalen Karzinogenese. Für die Tumorumitiation sind Mutationen von APC-, β -catenin- oder Axin-Genen notwendig. Die weitere Tumorprogression ist mit der Akkumulation von genetischen Veränderungen (z.B. in K-ras-, Smad4- und p53-Genen) und genomischer Instabilität assoziiert [Abbildung adaptiert nach [89]].

2.5 CD97/ADGRE5

CD97/ADGRE5, im Weiteren als CD97 bezeichnet, ist ein *G protein-coupled receptor* der zu der Gruppe der Adhäsions-GPCRs zuzuordnen ist [115]. CD97 besteht aus einem langen extrazellulären N-terminalen Fragment (NTF, früher α -Untereinheit), das mehrere hintereinander angeordnete EGF-ähnliche Domänen trägt. NTF ist nicht-kovalent an ein C-terminales Fragment (CTF, früher β -Untereinheit) gebunden [116, 117, 118]. CTF besteht aus einer *seven-transmembrane (TM7)-domain* sowie dem intrazellulärem C-

Terminus. Diese nicht-kovalente Bindung wird über die GAIN-Domäne realisiert. Ein strukturelles Kennzeichen der GAIN-Domäne ist das Vorhandensein einer proteolytisch-wirksamen GPCR-Prozessierungsstelle (GPS), die Voraussetzung für die intrazelluläre autokatalytische Spaltung des Moleküls in NTF und CTF ist [119]. Die GAIN-Domäne wird strukturell sowohl vom NTF als auch vom CTF gebildet und wurde bei früheren Strukturcharakterisierungen von CD97 als *stalk* bezeichnet. Durch alternatives RNA-Splicing existieren 3 humane Isoformen von CD97 mit 3 – 5 EGF-ähnlichen Domänen, CD97 (EGF 125), CD97 (EGF 1235) und CD97 (EGF 1-5) [118] (Abb. 5).

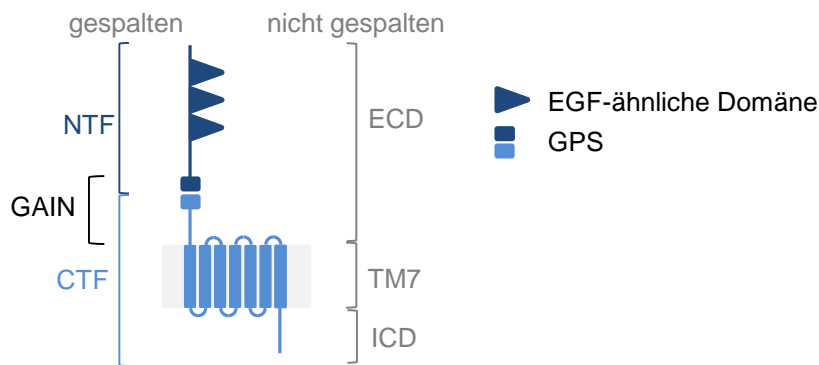


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Struktur von CD97

Dargestellt ist das C-terminale Fragment (CTF) von CD97, das nicht-kovalent an das extrazelluläre N-terminale Fragment (NTF) gekoppelt ist. Die *GPCR proteolysis site* (GPS) ist Teil der GAIN-Domäne, die strukturell sowohl vom NTF als auch vom CTF gebildet wird. Das NTF trägt die EGF-ähnlichen Domänen. ECD = extrazelluläre Domäne, TM7 = *seven-transmembrane domain*, ICD = intrazelluläre Domäne. [modifiziert nach [120]].

Bisher sind 4 extrazelluläre Interaktionspartner für CD97 beschrieben. Es handelt sich dabei um biochemisch und strukturell verschiedene nicht-lösliche Liganden. Der erste ist CD55 (DAF, *decay-accelerating factor*) [121], ein Membranprotein, das eine Schutzfunktion vor Komplement-vermittelter Lyse hat. Bei dem zweiten bekannten Ligand handelt es sich um Chondroitin B Sulfat, ein Glykosaminoglykan, das eine Rolle bei der Zellanhaftung spielt [122]. Der dritte Ligand ist alpha-5 beta-1 Integrin, welches ebenfalls Funktionen bei der Zelladhäsion übernimmt [123]. 2012 wurde Thy-1 (CD90) als 4. Ligand auf aktivierten Endothelzellen beschrieben [124]. Das C-terminale Fragment (CTF) ist für Interaktionen mit heterotrimeren und nicht-heterotrimeren G-Proteinen, sowie für transmembranäre und intrazelluläre Bindungspartner geeignet [116].

Ursprünglich wurde CD97 auf Zellen des hämatopoetischen Systems entdeckt [125]. Jedoch ist CD97 ubiquitär in normalen als auch benigne- und maligne transformierten Geweben aller drei Keimblätter nachweisbar (Tab. 2). CD97 wird im Vergleich von malignen Tumorzellen zu korrespondierenden normalen Zellen oft induziert bzw. hoch reguliert. Die Expression von CD97 korreliert mit der Entdifferenzierung bei Schilddrüsenkarzinomen [126, 127]. Die Expression von CD97 bei Zellen von Gallenblasenkarzinomen und Glioblastomen korreliert invers mit dem Gesamtüberleben der Patienten [128, 129]. Bei akuten lymphatischen Leukämien konnte CD97 als Marker zur Detektion der Minimalen Resterkrankung [130] und als einer der Oberflächenmarker zur Unterscheidung von benignen und malignen Zellen identifiziert werden [131]. CD97 ist ein Stammzellmarker bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) [132].

Tabelle 2: Zell- und Gewebeexpression von hCD97

Gewebe	Literaturquelle(n)
- normal; benigne Tumore	
Granulozyten Aktivierte Lymphozyten Ruhende B- und T-Lymphozyten (niedrige Level) Monozyten, Makrophagen, Mikroglia Dendritische Zellen	[125, 133, 134]
Hautfibroblasten	[135]
Pankreasepithelzellen bei Pankreatitis	[136]
Glatte Muskelzellen	[133, 137]
Fettzellen	[138]
Intestinale Epithelzellen	[139]
- maligne Tumore	
Schilddrüsenkarzinome	[126, 127]
Pankreaskarzinome	[136, 140]
Kolorektale Adenokarzinome	[141]
Magenkarzinome Ösophaguskarzinome	[140]
Orale Plattenepithelkarzinome	[142]
Prostatakarzinome	[143]
Primäres Gallenblasenkarzinom	[128]
Leiomyosarkome	[137]
Maligne Gliome	[144]

CD97 ist im normalen humanen Darmepithel in den lateralen Zellkontakten lokalisiert [139]. In transgenen Mäusen, die CD97 selektiv in normalen intestinalen Epithelzellen überexprimieren, werden die AJ durch Stabilisierung des nicht-phosphorylierten membran-gebundenen β -catenins verstärkt [139]. Dieser Fakt ist ein Hinweis darauf, dass CD97 an der Regulation von β -catenin beteiligt ist.

Im Gegensatz dazu wird CD97 in humanen kolorektalen Karzinomen sowohl im membranären als auch zytoplasmatischen Zellkompartiment exprimiert [141]. Insbesondere sogenannte *scattered* Tumorzellen an der Invasionsfront des kolorektalen Karzinoms exprimieren CD97 im Vergleich zu Zellen im Tumorzentrum höher. Dieses Phänomen geht mit einem höheren Tumorstadium und verstärkter Lymphgefäßinvasion einher [141]. Interessanterweise kommt es in diesen Zellen an der Invasionsfront von kolorektalen Karzinomen ebenfalls zu einer starken zytoplasmatischen sowie nukleären Expression von β -catenin [145]. Diese nukleäre Akkumulation von β -catenin ist Ausdruck der intrazellulären Fehlregulation des kanonischen Wnt-Signalweges mit daraus resultierender Aktivierung von Onkogenen und Karzinomprogression (Abb. 3). Das Vorhandensein dieser *scattered* Tumorzellen an der Invasionsfront bezeichnet man auch als *tumor budding*.

Die histologische Lokalisation von CD97 im kolorektalen Normal- und Karzinomgewebe ließ zunächst vermuten, dass CD97 ein direktes β -catenin/Tcf-Zielgen im fehlregulierten Wnt-Signalweg ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in kolorektalen Karzinom-Zelllinien mit induzierbarem dominant-negativen Tcf die CD97 mRNA-Level nicht durch Tcf beeinflusst werden. Die CD97-Promotor-Aktivität wird nicht durch Ko-Expression von Wildtyp oder S33A mutiertem β -catenin mit Tcf-4 gesteigert. CD97 ist somit kein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges [146].

3. Ziele

CD97 und β -catenin sind im humanem Darm in den lateralen Zellkontakten der Enterozyten lokalisiert [74, 139]. Eine Überexpression von CD97 in normalen intestinalen Epithelzellen von transgenen Tg(villin-CD97) Mäusen führt zur Akkumulation von nicht-phosphoryliertem membrangebundenem β -catenin in AJ, wodurch diese Zellkontakte stabilisiert werden und die Tiere im Modell der DSS-induzierten Kolitis kaum erkranken [139]. In humanen kolorektalen Karzinomen ist CD97 in sogenannten *scattered* Tumorzellen an der Invasionsfront stärker exprimiert als in Tumorzellen im Zentrum des Karzinoms [141]. β -catenin ist in diesen *scattered* Tumorzellen überwiegend im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert [145]. Bis jetzt ist es unbekannt, ob CD97 direkt mit β -catenin interagiert und ob diese Interaktion auch in humanen normalen und maligne transformierten kolorektalen Geweben stattfindet.

In der vorliegenden Arbeit soll daher geklärt werden, ob CD97 und β -catenin im humanen kolorektalen Normalgewebe und im korrespondierenden Karzinomgewebe kolokalisiert sind. Dieser Nachweis der Kolokalisation von CD97 und β -catenin in humanen kolorektalen Geweben ist ein grundlegender Hinweis auf eine mögliche Interaktion beider Moleküle. Bisher gibt es keine immunhistochemische Studie, die die Lokalisation von CD97 und β -catenin in normalem und malignem kolorektalem Gewebe parallel vergleichend analysiert. Der Grund dafür ist, dass CD97 im kolorektalen Gewebe bisher nur im Kryostat-Schnitt immunhistochemisch visualisiert werden konnte [141]. Die immunhistochemische Darstellung der nukleären Expression von β -catenin ist jedoch nur in Paraffin-eingebetteten Geweben möglich [75].

Deshalb ist es wichtig, zuerst eine immunhistochemische Färbemethode zu etablieren, mit der CD97 in Paraffin-eingebetteten humanen Geweben dargestellt werden kann. Danach wird evaluiert, ob sich die Ergebnisse der immunhistochemischen Darstellung von CD97 in Kryo-konservierten [141] in Paraffin-eingebetteten kolorektalen Geweben reproduzieren lassen. Es wird geklärt, ob es zu einer Zunahme der Expression von CD97 im Vergleich von kolorektalen Normal- zu Karzinomgewebe kommt; ob CD97 in den *scattered* Tumorzellen an der Invasionsfront stärker exprimiert wird als in Zellen im Karzinomzentrum und ob Karzinome mit einer Expression von CD97 in den *scattered* Tumorzellen ein höheres Tumorstadium und eine erhöhte Lymphgefäßinvasion gegenüber Karzinomen mit uniformen Färbeverhalten von CD97 aufweisen. Anschließend ist zu klären, ob in kolorektalen Tumorzellen eine Änderung der intrazellulären Lokalisation von CD97 ähnlich wie für β -catenin erfolgt. Wenn es für CD97 und β -catenin in der kolorektalen Tumorgenese zu einer Änderung der Lokalisation von den lateralen Zellkontakten in das Zellinnere kommt, ist zu klären, ob diese Prozesse miteinander korrelieren. Das wäre ein Hinweis dafür, dass CD97 und β -catenin miteinander interagieren. Abschließend wird der Zusammenhang zwischen der Lokalisation von CD97 und β -catenin im kolorektalem Karzinom und den klinischen Parametern im Patientenkollektiv ermittelt.

4. Materialien und Methoden

4.1 Ethikantrag

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig genehmigte die Ethikanträge zur Untersuchung von humanen kolorektalen Normal- und Karzinomgeweben (No. 028/2000 und No. 111/2009). Alle Patienten, die in diese Studie eingeschlossen wurden, willigten schriftlich in die Teilnahme ein.

4.2 Antikörper für Immunhistochemie

In den Tabellen 3 und 4 sind die Primär- und Sekundärantikörper aufgeführt, die in dieser Studie verwendet wurden.

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper für immunhistochemische Färbungen und Western Blot

Immunisiert mit	Gegen Spezies	Klonalität, Ursprung	Firma	Katalognr.	Nutzung	Verdünnung	Nachfolgend bezeichnet als
CD97 Antikörper							
3. zyto-plasmatische Domäne von CD97 (CTF)	human	polyklonal, Kaninchen	Abcam	13345	IHC, IF	1:50 bis 1:175	CD97_AK1
aa 220-270	human, murin	polyklonal, Kaninchen	Imgenex	IMG-5893A	IHC, IF	1:50 bis 1:400	CD97_AK2
N-terminale extrazelluläre Domäne von CD97 (NTF)	human	polyklonal, Kaninchen	Imgenex	IMG-71179	IHC, IF	1:50	CD97_AK3
N-terminale extrazelluläre Domäne von CD97 (NTF)	human	polyklonal, Kaninchen	Imgenex	IMG-71178	IHC, IF	1:50	CD97_AK4
CD97 <i>stalk</i> (GAIN-Domäne des NTF)	human	mono-klonal (MEM180), Maus	Immuno-tools	21270971	IHC	1:100	CD97_AK5
<i>Precursor recombinant protein epitope signature tag</i> (PrEST), NTF	human	polyklonal, Kaninchen	Sigma Aldrich	HPA013707	IHC, IF	1:100	CD97_AK6
<i>full length protein</i>	human	polyklonal, Maus	Abnova	H00000976-B01	IF	1:500	CD97_AK7
C-terminales Peptid TSQTRALRSSESG (CTF)	human, murin	polyklonal, Kaninchen	*	-	WB	1:100	CD97_AK8

β-catenin Antikörper							
aa 680-781 (C-Terminus)	human	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz	sc-7199	IHC	1:180	β-catenin_AK1
aa 571-781	human	monoklonal (14-β- catenin), Maus	BD Trans- duction Labs	610153	IF	1:80	β-catenin_AK2

* bereitgestellt von H. Haase, Max-Delbrück Zentrum Berlin

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper für immunhistochemische Färbungen

Name	Ursprung	Gegen Spezies	Kopplung/ Markierung	Firma	Katalognr.	Nutzung	Verdünnung
BA1000	Ziege	Kaninchen	Biotin	Vector Laboratories	BA1000	IHC	1:200
ImmPress Kit <i>rabbit</i>		Kaninchen	Peroxidase	Vector Laboratories	MP-7401	IHC	<i>ready-to- use</i>
ImmPress Kit <i>mouse</i>		Maus	Peroxidase	Vector Laboratories	MP-7402	IHC	<i>ready-to- use</i>
DyLight 549	Ziege	Kaninchen	DyLight-TFP ester (rot)	Dianova	111-506- 047	IF	1:150
Alexa 488	Huhn	Maus	FITC (grün)	Invitrogen	A-21467	IF	1:100
Cy3 IgG F(ab') ₂ Fragment	Kaninchen	Maus	Cy3 (rot)	Jackson Immuno- research	315-166- 047	IF	1:200
(ZAK) IgG F(ab') ₂ fragment Alexa Fluor 546	Ziege	Kaninchen	Alexa 546 = Cy3 (rot)	Molecular Probes	A11071	IF	1:200

4.3 Patientenkollektiv

Für diese histologische Studie wurden Gewebe von 111 sporadischen kolorektalen Adenokarzinomen verwendet. Diese Gewebe stammen von Patienten, die sich im Zeitraum zwischen Oktober 1999 und Juli 2001 in der Chirurgischen Klinik II für Visceral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Leipzig einer Operation unterzogen haben. Von allen Patienten liegen Proben des normalen kolorektalen Gewebes vor, welches mindestens 5 cm von dem kolorektalen Karzinom entfernt entnommen wurden. Die histologische Diagnose und das Staging gründeten sich auf der TNM-Klassifikation (7. Auflage 2010). Weiterhin wurde jeder Tumor histologisch untersucht und eingeteilt nach: i) der Differenzierung/Grading, entsprechend dem vorherrschendem Wachstumsmuster, ii) dem Vorhandensein von Tumorzellinvasion in Blut- und Lymphgefäßen und iii) dem Nachweis von kleinen undifferenzierten Karzinomzellgruppen, sogenannten *scattered* Tumorzellen, vor der Invasionsfront des Tumors, dem sogenannten *tumor budding*. Die Patienten wurden anhand der Ausprägung des *tumor*

budding in 2 Gruppen unterteilt: nicht vorhanden/schwach und mäßig/stark. In Tabelle 5 ist das verwendete Patientenkollektiv charakterisiert.

Tabelle 5: Charakterisierung des Patientenkollektivs und der kolorektalen Karzinome

Variable	Anzahl (%)
Patienten (n = 111)	
- Weiblich	68 (61.3)
- Männlich	43 (38.7)
Alter bei Diagnose (68.9 ± 10.9 Jahre)	
- < 70 Jahre	49 (44.1)
- ≥ 70 Jahre	62 (55.9)
Status des Primärtumors (pT)	
- pT1	3 (2.7)
- pT2	13 (11.7)
- pT3	76 (68.5)
- pT4a	18 (16.2)
- pT4b	1 (0.9)
Lymphknotenstatus (pN)	
- pN0	52 (46.8)
- pN1a	16 (14.4)
- pN1b	20 (18.0)
- pN1c	1 (0.9)
- pN2a	11 (9.9)
- pN2b	10 (9.0)
- pNx	1 (0.9)
Fernmetastasen (pM)	
- pM0	60 (54.1)
- pM1	20 (18.0)
- pMx	31 (27.9)
WHO-Stadium	
- I	10 (9.0)
- IIA	34 (30.6)
- IIB	6 (5.4)
- IIIA	6 (5.4)
- IIIB	29 (26.1)
- IIIC	6 (5.4)
- IV	20 (18.0)
Grading (g)	
- G1 – gut differenziert	2 (1.8)
- G2 – mäßig differenziert	76 (68.5)
- G3 – schlecht differenziert	33 (29.7)
V-Stadium (vaskuläre Invasion)	
- V0	89 (80.2)
- V1	22 (19.8)
L-Stadium (Lymphgefäßinvasion)	
- L0	85 (76.6)
- L1	26 (23.4)
<i>tumor budding</i>	
- nicht vorhanden/schwach	61 (54.9)
- mäßig/stark	50 (45.1)

4.4 Immunhistochemische Färbemethode

Für den Vergleich der Expression von CD97 und β -catenin in Paraffin-eingebetteten humanen kolorektalen Geweben wurden immunhistochemische Färbungen mit enzymatischem sekundärem Nachweissystem etabliert. Bei der Färbemethode mit enzymatischem sekundärem Nachweissystem kann neben der gewünschten Antigendarstellung auch die jeweilige Gewebestruktur dargestellt und somit mit in die Auswertung einbezogen werden. Für alle Färbungen wurden 5 μ m dicke Gewebeschnitte verwendet.

Die Färbungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 20 Minuten Erwärmung der Gewebeschnitte im Wärmeschrank (Heraeus Instruments Function Line Typ T12) bei 65°C
- Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe:
 - 2 x 5 Minuten in Xylol
 - je 3 Minuten in absolutem, 96%-, 80%- und 70%igem Ethanol
- Blockade der endogenen Peroxidase-Aktivität:
 - Inkubation in 1.0%iger H_2O_2 /96%-Ethanol Lösung zwischen absolutem und 96%igem Ethanol für 5 Minuten
- *Antigen-Retrieval*:
 - 4-minütiges Kochen der Objektträger im 0.01M Citrat Puffer pH 6.0 im Schnellkochtopf (Fissler Blue-Point) bei gleichbleibendem Druck von 1,5 bar
 - Abkühlung für 41 Minuten bei Raumtemperatur
 - Abspülen des Citrat Puffers mit Aqua dest.
 - Waschschrift
- Primärantikörper (Tab. 3), Inkubation für 30 Minuten, Waschschrift
- Spezies-spezifischer Sekundärantikörper (Tab. 4), Inkubation für 30 Minuten
 - bei Nutzung des Sekundärantikörpers BA1000 von Vector Laboratories folgt auf einen Waschschrift eine 30-minütige Inkubation mit dem Vectastain Elite ABC-Kit Standard (Vector Laboratories Inc. Burlingame, US)
- Waschschrift
- 10 Minuten Inkubation mit Diaminobenzidin (SIGMA FAST™ 3,3'-Diaminobenzidine Tabletten, Sigma Aldrich)
- Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun (Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Dr.K.Hollborn&Söhne) für 30 Sekunden
- Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe:
 - je 5 Minuten in 70%-, 80%-, 96%igem absolutem Ethanol und Xylol
- Eindeckeln der Objektträger mit Mountex-Gel (Mountex®, MEDITE GmbH REF 41-4021-00)

Nach dem *Antigen Retrieval* erfolgten zwischen jedem der Inkubationsschritte Waschschriffe mit einem *phosphate buffered saline* (PBS)/Tween Waschpuffer für 3 x 5 Minuten. Nach Applikation des sekundären Nachweissystems erfolgen die Waschschriffe für 3 x 5 Minuten mit PBS Waschpuffer ohne Zusatz von Tween. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in PBS.

Alle Inkubations- und Waschschriffe fanden bei Raumtemperatur statt.

Folgende Lösungen wurden eingesetzt:

- Xylol (J.T. Baker)
- Ethanol (Dr. K.Hollborn&Söhne EG): Verdünnung mit Aqua dest. zur Herstellung der 96%-, 80%- und 70%igem Ethanolösungen
- 0.01M Citrat Puffer pH 6.0:
 - Citronensäure (Carl Roth GmbH Art.nr: 6490.3) in Aqua dest.
- 0.2%igen Tween/PBS Waschpuffergemisch:
 - Tween® 20 (Carl Roth GmbH Art.nr: 9127.1) gemischt mit
 - PBS (Apotheke Universitätsklinikum Leipzig, Inhaltsstoffe: Dinatrium-hydrogenphosphat-2-Hydrat, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid DAB 10, Aqua dest.)

Als Positivkontrolle für alle durchgeführten Färbungen diente Gewebe eines G2-Rektumkarzinoms in dem bereits in Kryostat-Schnitten CD97 und β -catenin nachgewiesen wurden. Ein irrelevanter Antikörper des gleichen Isotyps in gleicher Konzentration des jeweils verwendeten Primärantikörpers diente als Negativkontrolle.

4.5 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Darstellung der kolorektalen Gewebe mittels Immunfluoreszenz wurde die neu etablierte immunhistochemische Färbung adaptiert, um eine einfache als auch eine Doppel-Immunfluoreszenzfärbung der kolorektalen Gewebe durchzuführen. Insbesondere zum Nachweis der Kolo-kalisation von CD97 und β -catenin ist die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung geeignet. Im Gegensatz zur Färbung mit enzymatischem sekundärem Nachweissystem können die nicht-markierten Gewebestrukturen in der Immunfluoreszenz schwieriger beurteilt werden.

Es wurden 5 μ m dicke Gewebeschnitte verwendet.

Bis einschließlich des Schrittes *Antigen Retrieval* ist das Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung identisch mit dem der Färbemethode mit enzymatischem sekundärem Nachweissystem. Folgende Schritte schließen sich an:

- 1. Primärantikörper (Tab. 3), Inkubation für 2 Stunden, Waschschrift
- 1. Sekundärantikörper (Tab. 4), Inkubation für 1 Stunde, Waschschrift

Bei der einfachen Immunfluoreszenzfärbung:

- Eindeckeln der Objektträger mittels Mounting Medium mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Gegenfärbung der Zellkerne

Bei der Doppel-Immunfluoreszenzfärbung:

- 2. Primärantikörper (Tab. 3), Inkubation für 2 Stunden, Waschschrift
- 2. Sekundärantikörper (Tab. 4), Inkubation für 1 Stunde, Waschschrift
- Eindeckeln der Objektträger mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Zwischen jedem der Inkubationsschritte erfolgten 3 x 5-minütige Waschschriffe mit PBS. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte ebenfalls mit PBS.

Alle Inkubations- und Waschschriffe fanden bei Raumtemperatur statt.

4.6 Zelllinien und WesternBlot

Für die Etablierung der neuen immunhistochemischen Färbemethode wurden verschiedene Zelllinien genutzt. Diese Zelllinien sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	ATCC®-Kennung	Spezies	Zelltyp
CHO-K1	CCL-61	Chinesischer Hamster	Ovarialzellen
WiDr	CCL-218	Homo sapiens	Kolorektale Adenokarzinomzellen
MDA-MB 231	HTB-26	Homo sapiens	Adenokarzinomzellen der Brustdrüse
Saos-2	HTB-85	Homo sapiens	Osteosarkom-Epithelzellen
HEK-293	CRL-1573	Homo sapiens	Embryonale Nierenepithelzellen
human rhabdomyosarcoma	-	Homo sapiens	Rhabdomyosarkomzellen
SkMc-p	-	Homo sapiens	Skelettmuskelzellen
Hs729.T	CRL-7767	Homo sapiens	Rhabdomyosarkomzellen
colon Tg(CD97-villin)2	-	Maus	Kolorektale Zellen
PBL	-	Homo sapiens	Periphere Blutlymphozyten

Die Western Blots wurden von der Arbeitsgruppe Aust zur Verfügung gestellt.

4.7 Histologische Auswertung und Scoring

Zur histologischen Auswertung wurde ein Lichtmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss Jena GmbH) verwendet. Die kolorektalen Gewebe jedes einzelnen Patienten unseres Kollektivs wurden von 2 voneinander unabhängigen Untersuchern auf die Färbung von CD97 und β -catenin hin untersucht. Dabei wurden Zellen im Tumorzentrum, Zellen an der Invasionsfront des Tumors und die sogenannten *scattered* Tumorzellen histologisch analysiert. Es wurde die Färbung der lateralen Zellkontakte, des Zytoplasmas und der Zellkerne beurteilt.

Die Prozentzahl der positiv gefärbten Zellkompartimente (laterale Zellkontakte, Zytoplasma und Zellkerne) im kolorektalem Normal- und Tumorgewebe wurde mit einem Punktwert von 0 bis 4 bewertet (0: ≤ 5 , 1: 6 – 25, 2: 26 – 50, 3: 51 – 75, 4: ≥ 75 % positiv gefärbte Zellen). Die Färbeintensität wurde mit einem Punktwert von 0 bis 3 abgeschätzt (0: negative, 1: schwache, 2: mäßige, 3: starke Färbung). Das Produkt aus dem Punktwert für die positiv gefärbten Zellkompartimente und dem Punktwert der Färbeintensität ergibt den Färbe-Score für jedes Kompartiment (0 – 12). Eine Gewebeprobe wurde dann als positiv, bezogen auf das getestete Antigen, bewertet, wenn ein Färbescore > 2 bestimmt wurde.

4.8 Statistik

Für die statistischen Analysen wurde der Wilcoxon-Test, der Fisher's Exact-Test und die Rangordnungskorrelation nach Spearman verwendet. Die statistischen Berechnungen wurden mit SPSS Version 20.0 (Chicago, IL, USA) durchgeführt. p-Werte kleiner als 0.05 wurden als signifikant gewertet.

5. Ergebnisse

5.1 Neue immunhistochemische Färbemethode zur Darstellung von CD97

Bisher konnte CD97 nur im Kryostat-Schnitt immunhistochemisch dargestellt werden [141]. Die immunhistochemische Darstellung der nukleären Expression von β -catenin ist jedoch nur in Paraffin-eingebetteten Geweben möglich [75]. Somit ist die Etablierung einer immunhistochemischen Färbemethode, die es erlaubt CD97 in Paraffin-eingebetteten humanen kolorektalen Geweben darzustellen, eine Grundvoraussetzung dieser Studie.

Es wurden verschiedene kommerziell erhältliche CD97 Antikörper unterschiedlicher Firmen getestet und untersucht, ob die Darstellung von CD97 in Paraffin-eingebetteten Geweben möglich ist. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper ist in Tabelle 3 zu finden.

5.1.1 Austesten der Antikörper in der enzymatischen Immunhistochemie

Mit den CD97 Antikörpern CD97_AK1, -AK2, -AK3, -AK4, -AK5 und -AK6 wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dafür wurden in Paraffin-eingebettete humane kolorektale Normal- und Tumorgewebe verwendet. Die verwendeten Konzentrationen der verschiedenen CD97-Antikörper wurden den beiliegenden Datenblättern der Hersteller entnommen und nachfolgend in Abhängigkeit vom Färbeergebnis optimiert.

5.1.2 Austesten der Antikörper in der Immunfluoreszenz

Mit den Antikörpern CD97_AK1, -AK2, -AK3 und -AK4 wurden zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen an zwei Zelllinien durchgeführt. Die erste Zelllinie ist CHO-K1, die mit dem Plasmid CD97-pEGFP-N1 oder CD97-deltaEGF-EGFP-N1 stabil transfektiert wurde. CD97-pEGFP-N1 kodiert ein Fusionsprotein aus der kurzen Isoform von humanem CD97 (EGF1,2,5) und dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). CD97-deltaEGF-EGFP-N1 kodiert humanes CD97 ohne die EGF-like Domänen. EGFP ist jeweils an den intrazellulären C-Terminus von CD97 fusioniert und lokalisiert somit das C-terminale Fragment (CTF) von CD97. Die zweite Zelllinie ist die kolorektale Adenokarzinomzelllinie WiDr. CD97 ist in diesen Zellen in lateralen Zellkontakten lokalisiert. Der Antikörper CD97_AK7 wurde als Kontroll-Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen an kultivierten Zellen verwendet. Für immunhistochemische Färbungen von in Paraffin-eingebetteten Geweben ist dieser Antikörper nicht geeignet (siehe unten).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Austestung der einzelnen CD97 Antikörper jeweils getrennt voneinander betrachtet. Die Testergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

5.1.3 Ergebnisse der Austestung der CD97 Antikörper

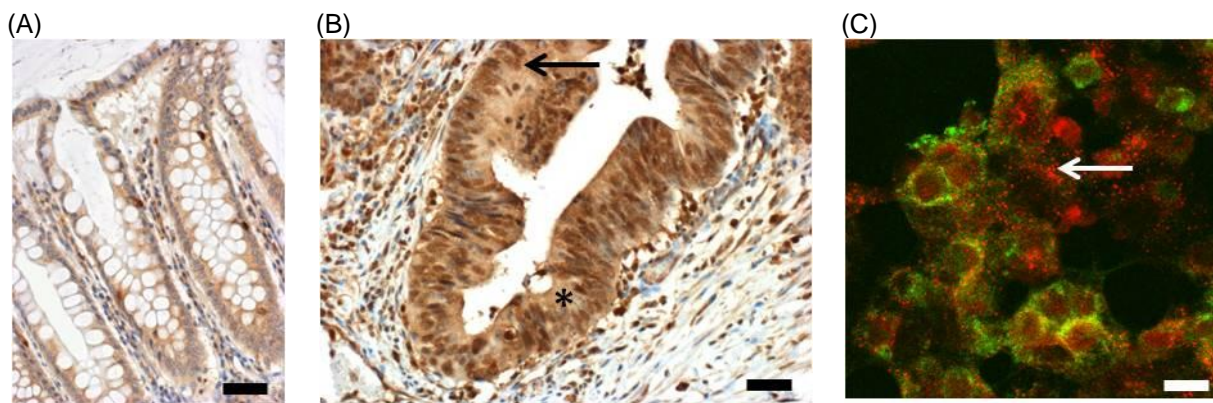
CD97_AK1 (Abcam 13345)

Immunhistochemie: Der Antikörper markiert im humanen kolorektalen Normalgewebe vorwiegend das Zytoplasma. Die Zellkontakte sind schwach CD97_AK1-positiv oder negativ (Abb. 6A). Im humanen kolorektalen Karzinomgewebe färbt der Antikörper die Tumorzellen. Die Zellkontakte werden dabei kaum dargestellt, sondern vorwiegend das Zytoplasma der Tumorzelle sowie einzelne Zellkerne (Abb. 6B). Leukozyten sind im Normal- als auch im Karzinomgewebe positiv.

Immunfluoreszenz an stabil transfektierten Zellen: In CHO CD97-pEGFP-N1 Zellen zeigt sich eine granuläre Markierung im Zytoplasma mit dem CD97_AK1. Es findet sich keine Kolokalisation mit EGFP, d.h. der Antikörper erkennt nicht das C-terminale Fragment (CTF) von CD97 (Abb. 6C).

Western Blot: Der CD97_AK1 wurde mit dem polyklonalen CD97_AK8 verglichen. Im Western Blot zeigt sich, dass der Antikörper CD97_AK8 eine Bande von 28 kDa in den CD97-positiven Zellen erkennt, die dem CTF von CD97 entspricht [Veninga, 2008]. Der Antikörper CD97_AK1 erkennt u.a. diese Bande in den CD97-positiven Zellen, aber auch weitere Banden. In Lysaten von CD97-negativen Zellen erkennt der Antikörper CD97_AK1 keine CD97-spezifischen Banden, dafür aber stark unspezifische Banden (Abb. 6D). Die Expression von CD97 in den Zelllinien wurde parallel in der Durchflußzytometrie bestimmt.

Fazit: Der Antikörper CD97_AK1 erkennt CD97, daneben aber noch andere Proteine. Aufgrund der unspezifischen Färbeargebnisse und der zusätzlichen unspezifischen Banden im Western Blot ist der Antikörper CD97_AK1 nicht für die geplante immunhistochemische Studie geeignet.



(D)

Position	Probe	Expression
1.	MDA-MB 231	CD97+
2.	Saos	CD97-
3.	HEK 293	CD97-
4.	HEK 293 transf.	CD97++
5.	.	.
6.	MDA-MB 231	CD97+
7.	SaOs	CD97-
8.	HEK 293	CD97-
9.	HEK 293 transf.	CD97++

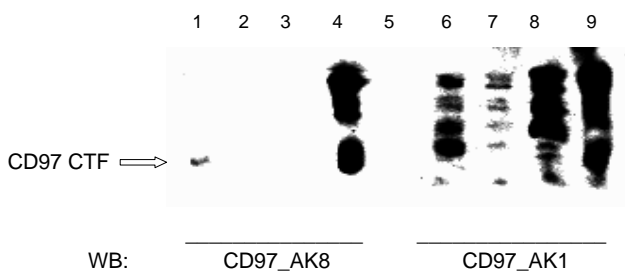


Abbildung 6: CD97_AK1 - Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen und des Western Blot

Immunhistochemie: (A) Der Antikörper markiert das Zytoplasma und schwach die lateralen Zellkontakten in normalen humanen kolorektalen Epithelzellen. (B) In kolorektalen Karzinomzellen wird vorwiegend das Zytoplasma (Stern) der Tumorzellen gefärbt. Zudem sind die Zellkerne in den Tumorzellen markiert (Pfeil). Leukozyten sind in (A) und (B) CD97_AK1-positiv. Immunfluoreszenz: (C) CHO CD97-pEGFP-N1-Zellen: EGFP ist grün; die Färbung mit dem Antikörper CD97_AK1 ist rot dargestellt. Der Antikörper CD97_AK1 markiert zytoplasmatische Granula (Pfeil). Es findet sich keine Übereinstimmung mit EGFP, d.h. der Antikörper erkennt nicht das C-terminale Fragment (CTF) von CD97. (D) Western Blot (mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. E. Wandel (Arbeitsgruppe Aust) zur Verfügung gestellt): Der Antikörper CD97_AK8 erkennt eine 28 kDa Bande in MDA-MB 231 Zellen, die CD97 exprimieren. Diese Bande entspricht dem CTF von CD97. Der CD97_AK1 erkennt ebenfalls die 28 kDa Bande in MDA-MB 231 Zellen, zusätzlich aber sowohl in CD97-positiven als auch in den CD97-negativen Saos- und HEK 293 Zellen zahlreiche unspezifische Nebenbanden. Maßstabsbalken: A 50µm; B 25µm; C 10µm.

CD97_AK2 (Imgenex IMG-5893A)

Immunhistochemie: In humanen kolorektalen Normalgeweben werden laterale Zellkontakte und Leukozyten stark markiert (Abb. 7A). Die Stabilität des Antikörpers wurde über einen Zeitraum von 3 Monaten in immunhistochemischen Färbungen getestet. Die Färbeergebnisse waren dabei extrem inkonstant, da es im Verlauf zu einer zunehmenden Aktivitätsabnahme des Antikörpers kam. Selbst bei geringerer Verdünnung des Antikörpers wurden Zellkontakte und sogar Leukozyten wesentlich schwächer markiert (Abb. 7B).

Immunfluoreszenz an stabil transfektierten Zellen: In den CHO CD97-pEGFP-N1 Zellen wird vor allem das Zytoplasma und der perinukleäre Bereich dargestellt. Der Antikörper CD97_AK2 und EGFP sind im Zytoplasma kolokalisiert, d.h. der Antikörper erkennt das CTF von CD97 (Abb. 7C). In den CHO CD97-deltaEGF-EGFP-N1 Zellen ist das Färbeergebnis des Antikörpers CD97_AK2 nahezu negativ (Abb. 7D). Das zeigt, dass der Antikörper im Bereich der extrazellulären EGF-Domänen von CD97 bindet. In den WiDr-Zellen erkennt der Antikörper CD97_AK2 nicht die lateralen Zellkontakte (Abb. 7E).

Fazit: Der Antikörper CD97_AK2 erkennt sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Immunfluoreszenz CD97. Jedoch zeigt sich ein Aktivitätsabfall des Antikörpers mit im Verlauf instabilen Färbeergebnissen. Es kommt auch bei Wahl einer geringeren Verdünnung des Antikörpers zu progredienten Aktivitätsabfällen. Da in der geplanten immunhistochemischen Studie kolorektale Gewebe eines großen Patientenkollektivs gefärbt werden sollen, ist es eine Grundvoraussetzung, dass die Antikörper über einen längeren Zeitraum stabile Färbeergebnisse zeigen. Somit ist der Antikörper CD97_AK2 für die geplanten Untersuchungen nicht geeignet.

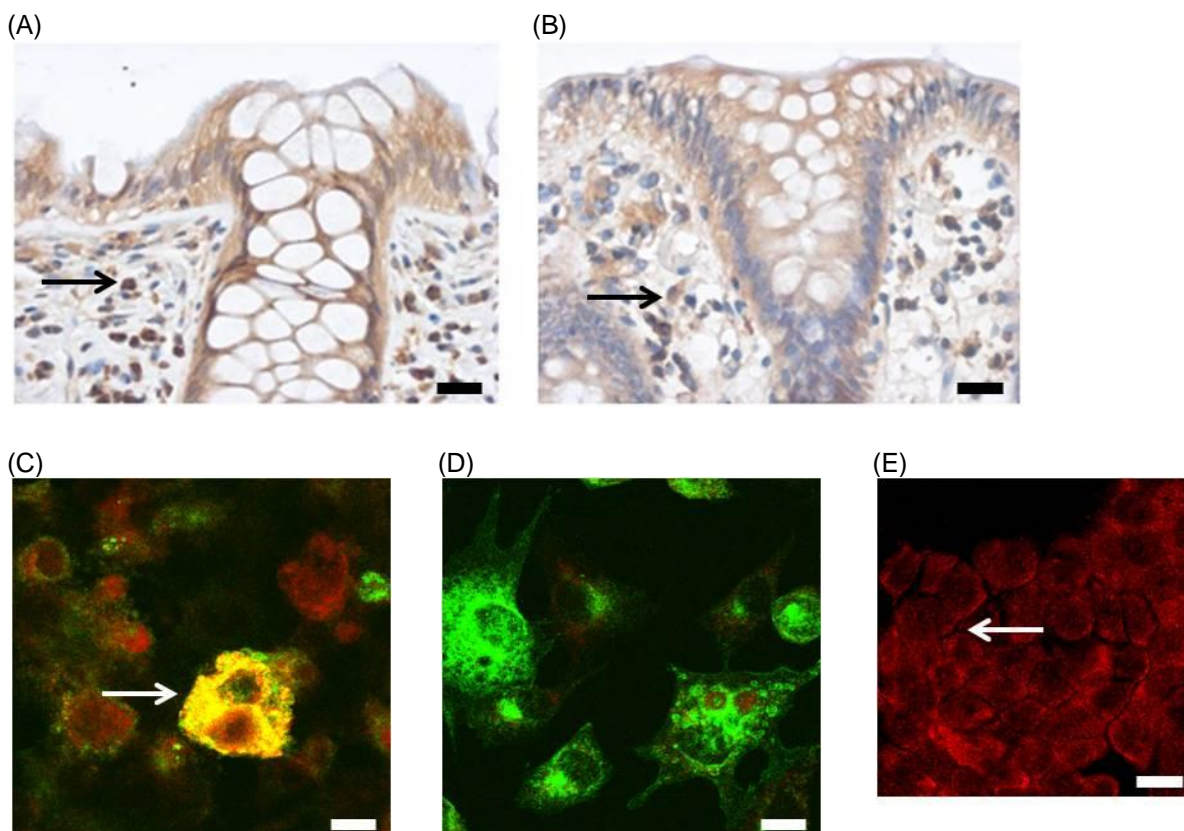


Abbildung 7: CD97_AK2 - Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Immunhistochemie: (A) Der Antikörper färbt die lateralen Zellkontakten und Leukozyten (Pfeil) von Zellen des kolorektalen Normalgewebes an. Verdünnung des Antikörpers CD97_AK2 = 1:175. (B) Färbung 3 Monate später mit Verdünnung des Antikörpers CD97_AK2 = 1:50. Trotz geringerer Verdünnung werden Zellkontakte und Leukozyten (Pfeil) wesentlich schwächer markiert. **Immunfluoreszenz:** (C) CHO CD97-pEGFP-N1-Zellen: EGFP ist grün, die Färbung mit dem Antikörper CD97_AK2 ist rot dargestellt. Der Antikörper stellt vor allem das Zytoplasma und den perinukleären Bereich dar. Der Antikörper CD97_AK2 und EGFP sind im Zytoplasma kolokalisiert (Pfeil), das bedeutet, dass hier das CTF von CD97 erkannt wird. (D) CHO CD97-deltaEGF-EGFP-N1: EGFP ist grün, die Färbung mit dem Antikörper CD97_AK2 ist rot dargestellt. Der Antikörper zeigt ein negatives Färbeergebnis. Es findet sich

keine Kolokalisation mit EGFP, das bedeutet, dass der Antikörper CD97_AK2 CD97 im Bereich der extrazellulären EGF-Domänen bindet. (E) WiDr-Zellen: CD97_AK2 ist rot. Die lateralen Zellkontakte werden nicht durch den Antikörper CD97_AK2 angefärbt (Pfeil). Maßstabsbalken: A,B 20µm; C,D,E 10µm.

CD97_AK3 (Imgenex IMG-71179)

Immunhistochemie: Der Antikörper färbt im humanen kolorektalen Normalgewebe die Leukozyten und das Zytoplasma an, wohingegen die Zellkontakte nicht dargestellt werden (Abb. 8A). Auch dieser Antikörper wurde über einen Zeitraum von 3 Monaten in immunhistochemischen Färbungen verwendet. Auch bei diesem Antikörper kommt es im Verlauf zu einer progredienten Aktivitätsabnahme und trotz geringerer Verdünnung werden das Zytoplasma der kolorektalen Zellen sowie die Leukozyten schwächer dargestellt (Abb. 8B).

Immunfluoreszenz an stabil transfektierten Zellen: In den CHO CD97-pEGFP-N1 Zellen wird vorwiegend das Zytoplasma und der Bereich um den Zellkern dargestellt (Abb. 8C). In den CHO CD97-deltaEGF-EGFP-N1 Zellen färbt der Antikörper CD97_AK3 das Zytoplasma an (Abb. 8D). Sowohl in den CHO CD97-pEGFP-N1 - als auch in den CHO CD97-deltaEGF-EGFP-N1 Zellen sind der Antikörper CD97_AK2 und das EGFP kolokalisiert. Das bedeutet, dass der Antikörper CD97_AK3 CD97 wahrscheinlich außerhalb der extrazellulären EGF-Domänen bindet. Durch den Antikörper CD97_AK3 kommt es nicht zur Darstellung der lateralen Zellkontakte der WiDr-Zellen (Abb. 8E).

Fazit: Der Antikörper CD97_AK3 erkennt in den immunhistochemischen- und in den Immunfluoreszenzfärbungen CD97. Allerdings zeigt sich wie bei CD97_AK2 ein progredienter Aktivitätsabfall mit instabilen Färbeergebnissen, sodass auch der Antikörper CD97_AK3 nicht für die geplante immunhistochemische Studie geeignet ist.

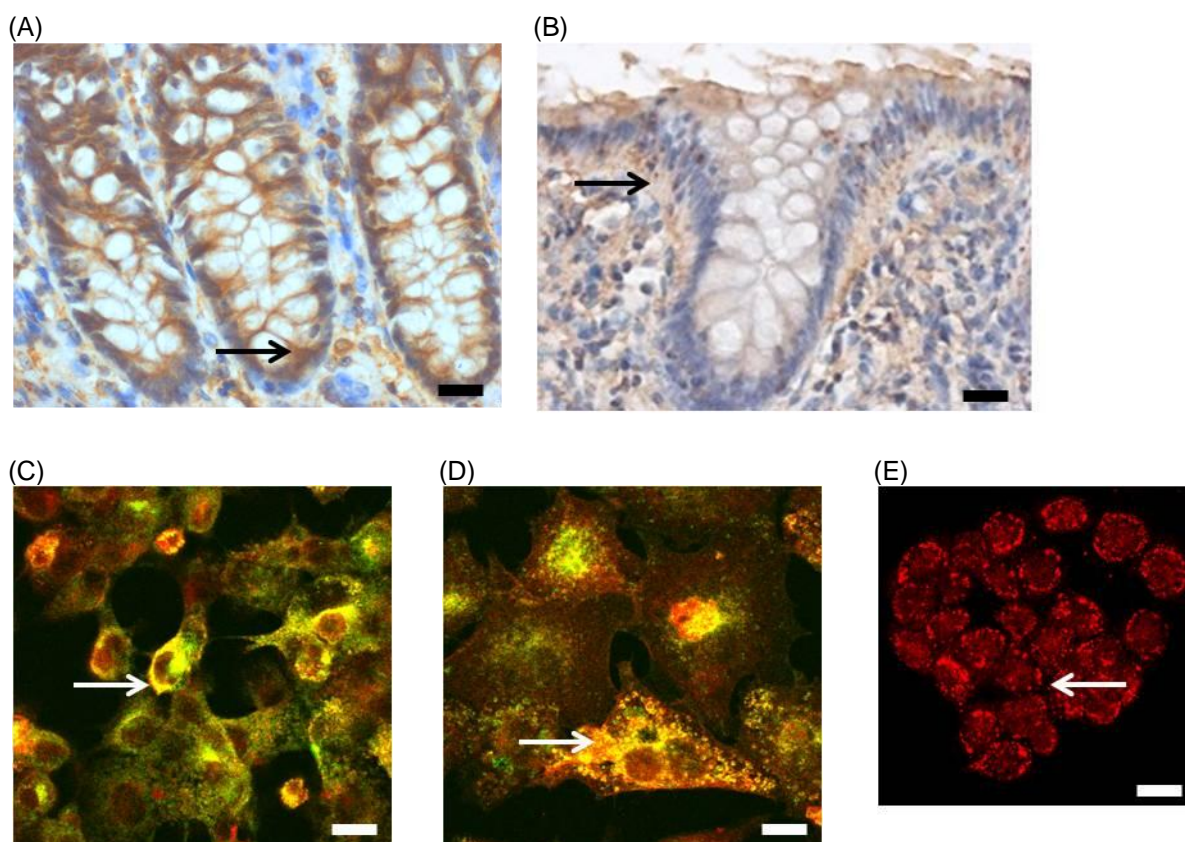


Abbildung 8: CD97_AK3 - Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Immunhistochemie: (A) Der Antikörper CD97_AK3 markiert Leukozyten und das Zytoplasma (Pfeil) von Zellen des kolorektalen Normalgewebes. Verdünnung des Antikörpers CD97_AK3 = 1:175. (B) Färbung 3 Monate später mit Verdünnung des Antikörpers CD97_AK3 = 1:50. Trotz geringerer Verdünnung werden Leukozyten und Zytoplasma (Pfeil) wesentlich schwächer markiert. Immunfluoreszenz: (C) CHO CD97-pEGFP-N1-Zellen: EGFP ist grün, die

Färbung mit dem Antikörper CD97_AK3 ist rot dargestellt. Der CD97 Antikörper markiert das Zytoplasma und das perinukleäre Areal. Der Antikörper CD97_AK3 und EGFP sind in diesem perinukleären Areal kolokalisiert (Pfeil). (D) CHO CD97-deltaEGF-EGFP-N1: EGFP ist grün, die Färbung mit dem Antikörper CD97_AK3 ist rot dargestellt. Der Antikörper erkennt das Zytoplasma. Auch in diesen Zellen ist der Antikörper CD97_AK3 und EGFP im Zytoplasma kolokalisiert (Pfeil). Das bedeutet, dass der Antikörper CD97_AK3 CD97 wahrscheinlich außerhalb der extrazellulären EGF-Domänen erkennt. (E) WiDr-Zellen: die Färbung mit dem Antikörper CD97_AK3 ist rot dargestellt. Die lateralen Zellkontakte werden nicht angefärbt (Pfeil). Maßstabsbalken: A,B 20µm; C,D,E 10µm.

CD97_AK4 (Imgenex IMG-71178)

Immunhistochemie: Sowohl im humanem kolorektalem Normalgewebe (Abb. 9A) als auch im Karzinomgewebe (Abb. 9B) zeigt dieser Antikörper negative Färbeergebnisse.

Immunfluoreszenz an stabil transfektierten Zellen: In den CHO CD97-pEGFP-N1 Zellen und in den CHO CD97-deltaEGF-EGFP-N1 kommt es zu keiner Kolokalisation mit EGFP, d.h. der Antikörper CD97_AK4 erkennt nicht das CTF von CD97 (Abb. 9C und 9D). WiDr-Zellen: Die lateralen Zellkontakte werden nicht durch den CD97_AK4 dargestellt (Abb. 9E).

Fazit: Dieser Antikörper zeigt sowohl in der Immunhistochemie als auch bei den Immunfluoreszenzfärbungen negative Ergebnisse und ist für die geplante immunhistochemische Studie ungeeignet.

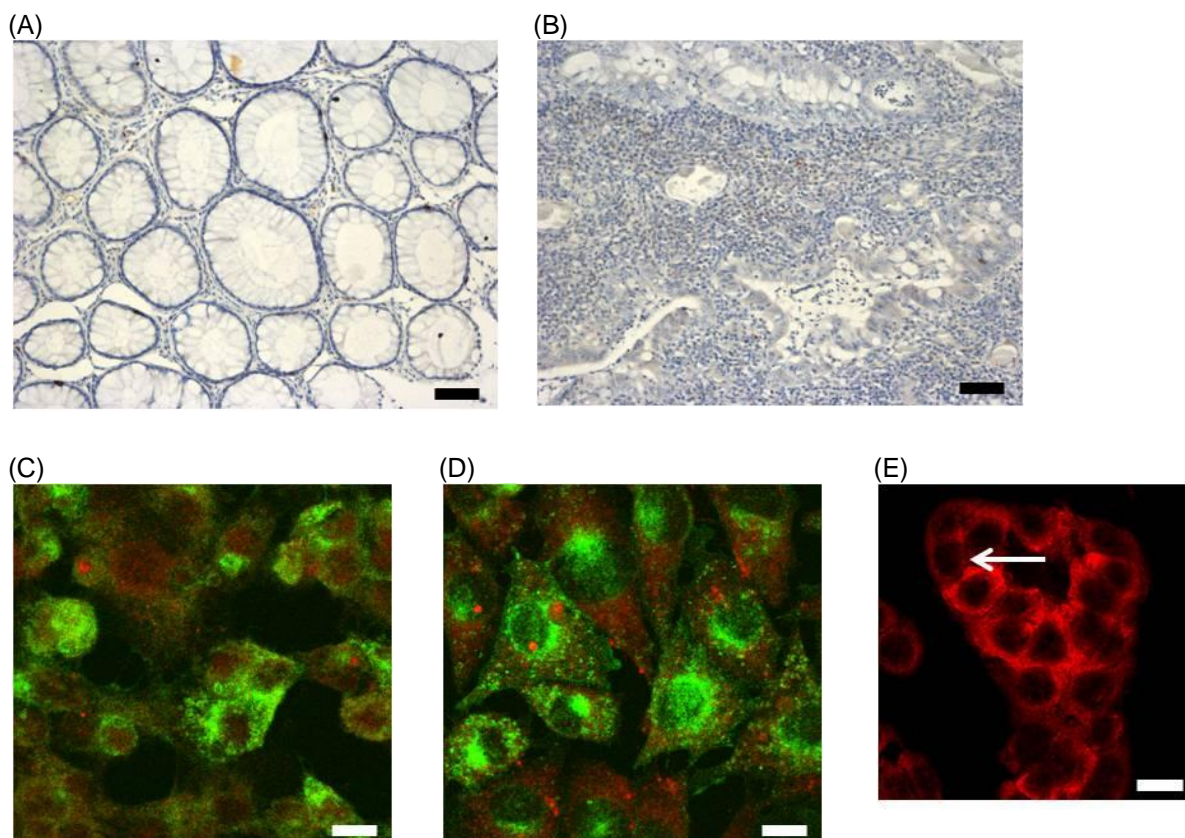


Abbildung 9: CD97_AK4 - Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Immunhistochemie: (A) Im kolorektalem Normalgewebe ist das Färbeergebnis des Antikörpers negativ. (B) Auch im kolorektalem Karzinomgewebe zeigt sich eine negatives Färbeergebnis des Antikörpers. Immunfluoreszenz: (C) CHO CD97-pEGFP-N1-Zellen: EGFP ist grün, die Färbung mit dem Antikörper CD97_AK4 ist rot dargestellt. Der Antikörper färbt nicht das CTF von CD97 an (rot ≠ grün). (D) CHO CD97-deltaEGF-EGFP-N1: EGFP ist grün, die Färbung mit dem Antikörper CD97_AK4 ist rot dargestellt. Auch hier markiert der Antikörper nicht das CTF von CD97. (E) WiDr-Zellen: die Färbung mit dem Antikörper CD97_AK4 ist rot dargestellt. Der Antikörper färbt nicht die lateralen Zellkontakte der WiDr-Zellen an (Pfeil). Maßstabsbalken: A,B 50µm; C,D,E 10µm.

CD97_AK5 (Immunotools 21270971)

Immunhistochemie: Dieser Antikörper zeigt durchgängig negative Ergebnisse in der Immunhistochemie.

Fazit: Aus diesem Grund ist der Antikörper CD97_AK5 für die geplante immunhistochemische Studie nicht zu gebrauchen.

CD97_AK6 (Sigma Aldrich HPA013707)

Immunhistochemie: Dieser Antikörper markiert in humanen kolorektalen Normalgeweben die lateralen Zellkontakte und die Leukozyten (Abb. 10A). In humanen kolorektalen Karzinomgeweben werden die Zellkontakte und das Zytoplasma der Tumorzellen sowie Leukozyten dargestellt (Abb. 10B). Es zeigt sich im Verlauf kein Aktivitätsabfall des Antikörpers.

Immunfluoreszenz an humanen kolorektalen Geweben: CD97 wird im Zytoplasma und stark in den lateralen Zellkontakten der Tumorzellen markiert (Abb. 10C). Der Antikörper zeigt stabile Färbeergebnisse.

Western Blot: Der CD97_AK6 wurde mit dem polyklonalen CD97_AK8 verglichen. Der Antikörper CD97_AK6 erkennt das N-terminale Fragment (NTF) von CD97, allerdings nur in humanen Zellen. Wie in 2.5 beschrieben, gibt es 3 humane Isoformen von CD97, die sich auf das Molekulargewicht des NTF von CD97 auswirken. Daher erkennt der CD97_AK6 3 unterschiedliche Banden in den untersuchten humanen Zellen, die diesen 3 Isoformen entsprechen. Wie bereits im Western Blot aus Abb. 6D zu sehen war, erkennt der CD97_AK8 auch in den Zellen dieses Western Blots eine Bande von 28 kDA, die dem CTF von CD97 entspricht. Der CD97_AK8 markiert das CTF von CD97 sowohl in humanen als auch in murinen Zellen (Abb. 10D).

Fazit: Der Antikörper CD97_AK6 erkennt in der Immunhistochemie stabil CD97. Er zeigt über mehrere Testfärbungen keinen signifikanten Aktivitätsabfall bei gleicher Verdünnung. Der Antikörper zeigt auch bei Immunfluoreszenzfärbungen stabil positive Ergebnisse. Im Western Blot erkennt der CD97_AK6 spezifisch das NTF von humanem CD97. Somit ist der Antikörper CD97_AK6 für unsere immunhistochemische Studie geeignet und wird für die weiteren CD97 Färbungen verwendet.

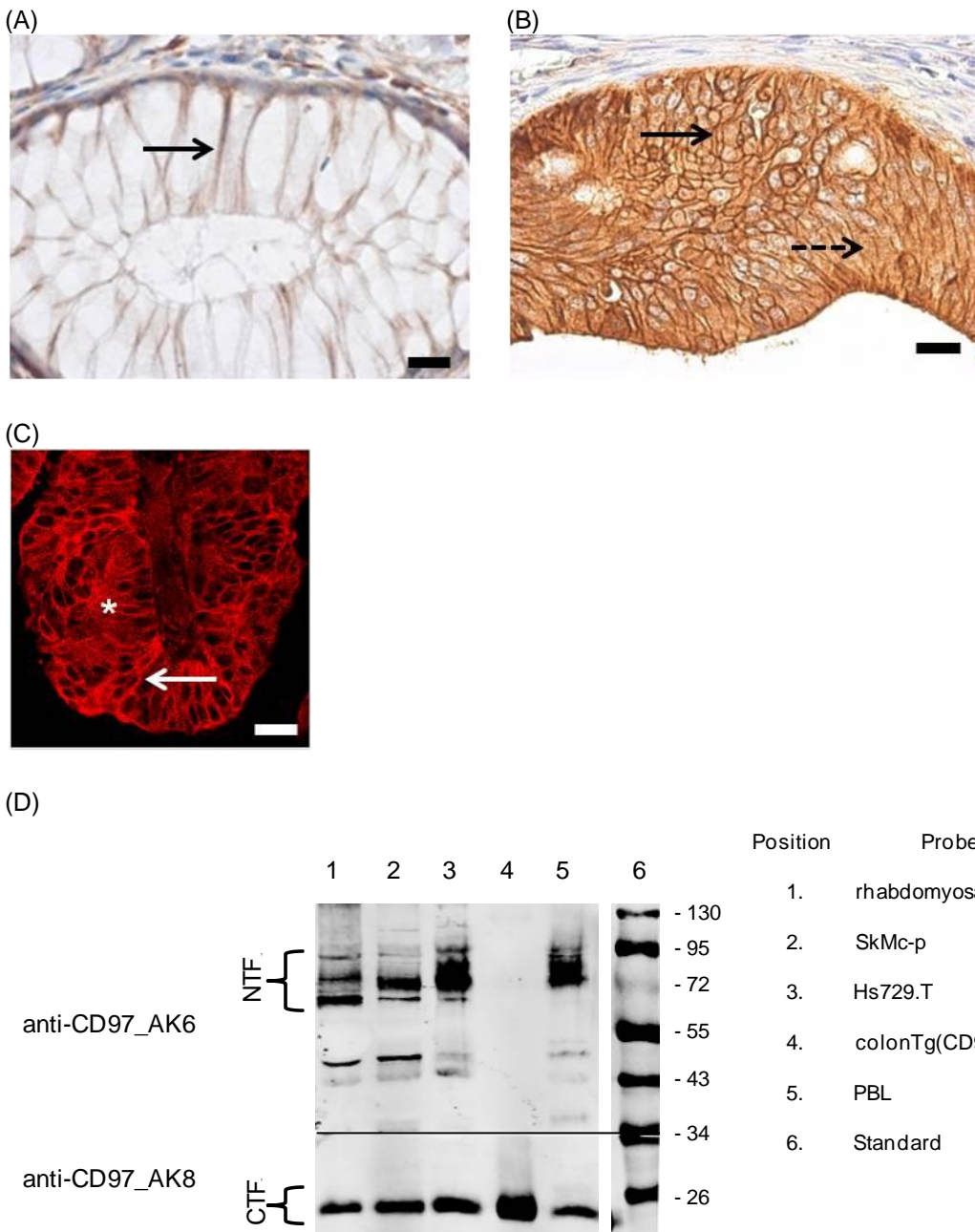


Abbildung 10: CD97_AK6 - Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Immunhistochemie: (A) Im kolorektalen Normalgewebe markiert der Antikörper CD97_AK6 die lateralen Zellkontakte (Pfeil) und die Leukozyten. (B) Im kolorektalen Karzinomgewebe färbt dieser Antikörper die lateralen Zellkontakte (durchgehender Pfeil), das Zytoplasma (gestrichelter Pfeil) und die Leukozyten an. Immunfluoreszenz: (C) Die Färbung des Antikörpers CD97_AK6 ist rot dargestellt. Er markiert das Zytoplasma (Stern) und vor allem die lateralen Zellkontakte (Pfeil) der Tumorzellen. (D) Western Blot: Der CD97_AK6 erkennt 3 Banden in allen untersuchten humanen Zellen, die dem N-terminalen Fragment (NTF) der 3 humanen Isoformen von CD97 entsprechen. Der CD97_AK6 erkennt nur humanes CD97. Der Antikörper CD97_AK8 erkennt eine 28 kDa Bande in allen untersuchten humanen und murinen Zellen. Diese Bande entspricht dem C-terminalen Fragment (CTF) von CD97. Maßstabsbalken: A,B,C 20µm.

CD97_AK7 (Abnova H00000976-B01)

Der Antikörper CD97_AK7 wurde für die Immunfluoreszenzfärbungen an stabil transfektierten Zellen als Kontroll-Antikörper verwendet. Dieser CD97 Antikörper erkennt CD97 im Bereich der extrazellulären EGF-Domänen. In den CHO CD97-pEGFP-N1 Zellen markiert der Antikörper CD97_AK7 das Zytoplasma und ist dort mit EGFP kolokalisiert (Abb. 11A). In den CHO CD97-deltaEGF-EGFP-N1 Zellen zeigt sich ein negatives Färberegebnis und eine fehlende Kolokalisation mit EGFP, d.h. dass der Antikörper CD97_AK7

wie oben beschrieben CD97 im Bereich der extrazellulären EGF-Domänen bindet (Abb. 11B). In den WiDr-Zellen werden die lateralen Zellkontakte gefärbt (Abb. 11C).

β -catenin_AK2 (BD Transduction Labs. 610153)

In den WiDr-Zellen ist β -catenin stark in den lateralen Zellkontakten exprimiert. Um diese lateralen Zellkontakte bei den Färbungen mit den CD97 Antikörpern sicher identifizieren zu können, wurden mit den WiDr-Zellen zusätzlich Kontrollfärbungen mit dem β -catenin_AK2 durchgeführt. Erwartungsgemäß werden die lateralen Zellkontakte markiert (Abb. 11D).

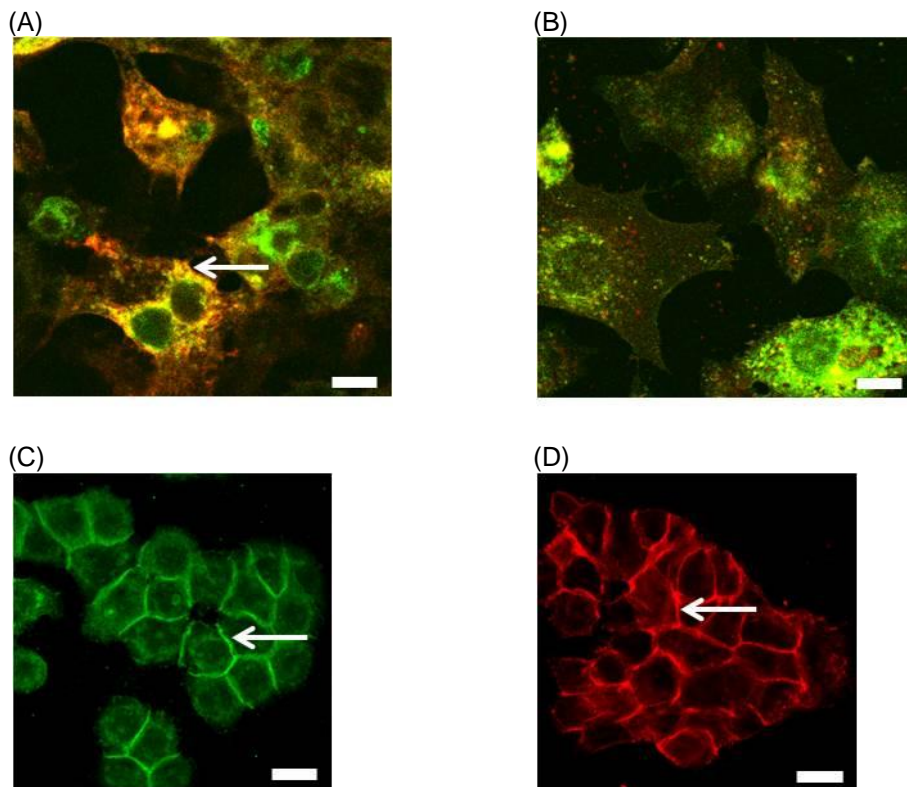


Abbildung 11: CD97_AK7 und β -catenin_AK2 - Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Immunfluoreszenz: (A) CHO CD97-pEGFP-N1-Zellen: EGFP ist grün, die Färbung mit dem Antikörper CD97_AK7 ist rot dargestellt. Der Antikörper CD97_AK7 markiert das Zytoplasma. Der Antikörper CD97_AK7 und EGFP sind im Zytoplasma kolokalisiert (Pfeil). (B) CHO CD97-deltaEGF-EGFP-N1: EGFP ist grün, die Färbung mit dem Antikörper CD97_AK7 ist rot dargestellt. Da der Antikörper CD97_AK7 CD97 im Bereich der extrazellulären EGF-Domänen bindet, ist das Färberegebnis negativ. (C) WiDr-Zellen: die Färbung mit dem Antikörper CD97_AK7 ist grün dargestellt. Der Antikörper CD97_AK7 färbt die lateralen Zellkontakte der WiDr-Zellen an (Pfeil). (D) WiDr-Zellen: die Färbung mit dem Antikörper β -catenin_AK2 ist rot dargestellt. Wie zu erwarten, färbt auch der Antikörper β -catenin_AK2 die lateralen Zellkontakte an (Pfeil). Maßstabsbalken: A,B,C,D 10 μ m.

In Tabelle 6 ist eine Zusammenfassung der Färbeergebnisse der einzelnen CD97 Antikörper dargestellt. Für unsere Studie an humanen kolorektalen wurde letztendlich der CD97_AK6 verwendet. Der CD97_AK7 diente als Kontroll-Antikörper für die durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunhistochemie- und Immunfluoreszenzfärbung mit verschiedenen CD97 Antikörpern

Antikörper	IHC kolorektale Gewebe Paraffin	IF CHO- Zellen	IF WiDr- Zellen	WB	Beurteilung	Verwendung für diese Studie
CD97_AK1	Zytoplasma, Zellkerne	unklar		CTF von CD97, unspezifische Nebenbanden	erkennt CD97, aber unspezifisch	nein
CD97_AK2	laterale Zellkontakte, Leukozyten	Zytoplasma	negativ		erkennt CD97, aber Aktivitäts- abnahme	nein
CD97_AK3	Zytoplasma, Leukozyten	Zytoplasma	negativ		erkennt CD97, aber Aktivitäts- abnahme	nein
CD97_AK4	negativ	negativ	negativ		erkennt nicht CD97	nein
CD97_AK5	negativ				erkennt CD97 nicht im Paraffin	nein
CD97_AK6	laterale Zellkontakte, Zytoplasma, Leukozyten			NTF von hCD97	erkennt stabil und spezifisch CD97	ja
CD97_AK7	negativ	Zytoplasma	laterale Zellkontakte			Kontroll-AK für IF

5.2 Expression von CD97 und β -catenin im kolorektalem Normalgewebe

CD97 wird in allen Schnitten des kolorektalen Normalgewebes (111/111) exprimiert. CD97 ist dabei vorwiegend in den lateralen Zellkontakten (Färbescore, Mittelwert \pm SEM: 6.68 ± 0.21 , Tab. 7, Abb. 12 und 14 a, b), aber auch im Zytoplasma der Zellen (3.68 ± 0.08) lokalisiert. Dabei stellt sich die Färbung von CD97 im Bereich der lateralen Zellkontakte eher unscharf und verschwommen dar. CD97 ist nicht im Zellkern exprimiert (Tab. 7, Abb. 12). In 100/111 der Normalgewebe zeigt sich ein Expressionsgradient von CD97 entlang der Krypt-Villus-Achse. Dabei kommt es zu einer stärkeren Expression von CD97 in Enterozyten im unteren Bereich der Krypte, wohingegen die mehr zum Darmlumen hin lokalisierten Enterozyten CD97 vergleichsweise schwächer exprimieren (Abb. 14 e).

Auch β -catenin wird in allen Schnitten des kolorektalen Normalgewebes exprimiert. Am stärksten ist β -catenin in den lateralen Zellkontakten der Enterozyten exprimiert (9.32 ± 0.21 , Tab. 8, Abb. 13 und 14 c, d). Die Färbung dieser lateralen Zellkontakte stellt sich bei β -catenin im Gegensatz zur Färbung von CD97 sehr scharf dar. β -catenin ist ebenfalls im Zytoplasma der Enterozyten lokalisiert (4.35 ± 0.11 , Tab. 8, Abb. 13 und 14 c). β -catenin ist nicht in den Zellkernen der normalen Enterozyten nachzuweisen (Tab. 8). Ein Expressionsgradient von β -catenin entlang der Krypt-Villus-Achse findet sich nicht (Abb. 14 f).

Tabelle 7: Expression von CD97 im Vergleich von normalen kolorektalen Epithelzellen- und Tumorzellen, n=111

Zellkompartiment	Färbescore Normalgewebe (Mittelwert ± SEM)	Färbescore Karzinomgewebe (Mittelwert ± SEM)	p-Wert
CD97, laterale Zellkontakte	6.68 ± 0.21	2.39 ± 0.18	< 0.0001*
CD97, Zytoplasma	3.68 ± 0.08	6.57 ± 0.15	< 0.0001*
CD97, Zellkern	0	0	-

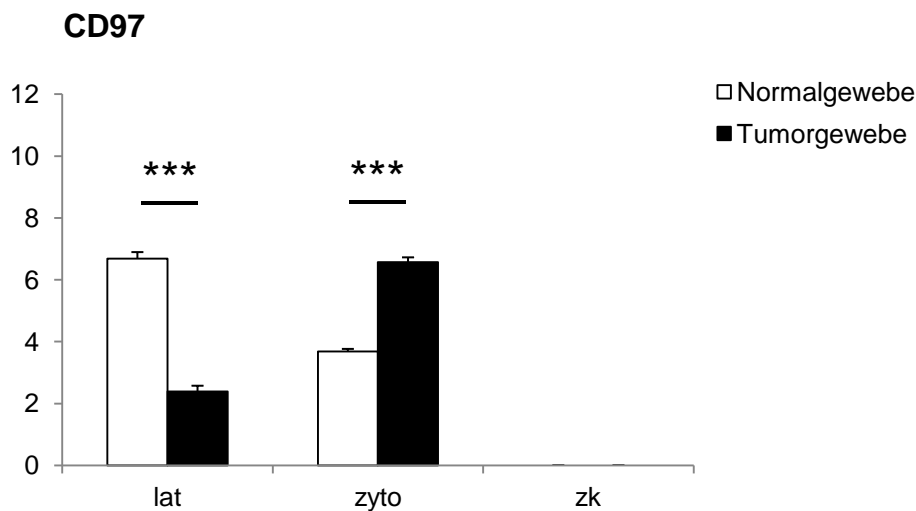


Abbildung 12: Darstellung der Mittelwerte der Färbescores von CD97 in den verschiedenen Zellkompartimenten im kolorektalem Normal- und Karzinomgewebe, n=111

Es kommt im Vergleich von kolorektalem Normal- zu Karzinomgewebe zu einer Änderung der Lokalisation von CD97 von den lateralen Zellkontakten in das Zytoplasma der kolorektalen Zellen. CD97 wird nicht im Zellkern exprimiert. Auf der y-Achse ist der histologische Färbescore aufgetragen. Abk.: lat = laterale Zellkontakte, zyto = Zytoplasma, zk = Zellkerne.

Tabelle 8: Expression von β -catenin im Vergleich von kolorektalem Normal- und Karzinomgewebe, n=111

Zellkompartiment	Färbescore Normalgewebe (Mittelwert ± SEM)	Färbescore Karzinomgewebe (Mittelwert ± SEM)	p-Wert
β -catenin, laterale Zellkontakte	9.32 ± 0.21	3.77 ± 0.23	< 0.0001*
β -catenin, Zytoplasma	4.35 ± 0.11	6.91 ± 0.18	< 0.0001*
β -catenin, Zellkern	0	2.62 ± 0.27	< 0.0001*

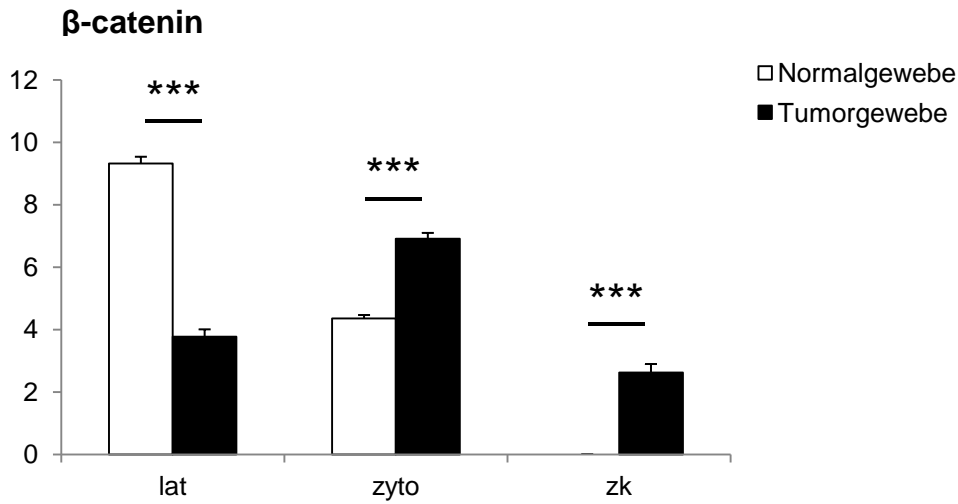


Abbildung 13: Darstellung der Mittelwerte der Färbescores von β-catenin in den verschiedenen Zellkompartimenten im kolorektalem Normal- und Karzinomgewebe, n=111

Es kommt im Vergleich von kolorektalem Normal- zu Karzinomgewebe zu einer Translokation von β-catenin von den lateralen Zellkontakten in das Zytoplasma und die Zellkerne der kolorektalen Zellen. Auf der y-Achse ist der histologische Färbescore aufgetragen. Abk.: lat = laterale Zellkontakte, zyto = Zytoplasma, zk = Zellkerne.

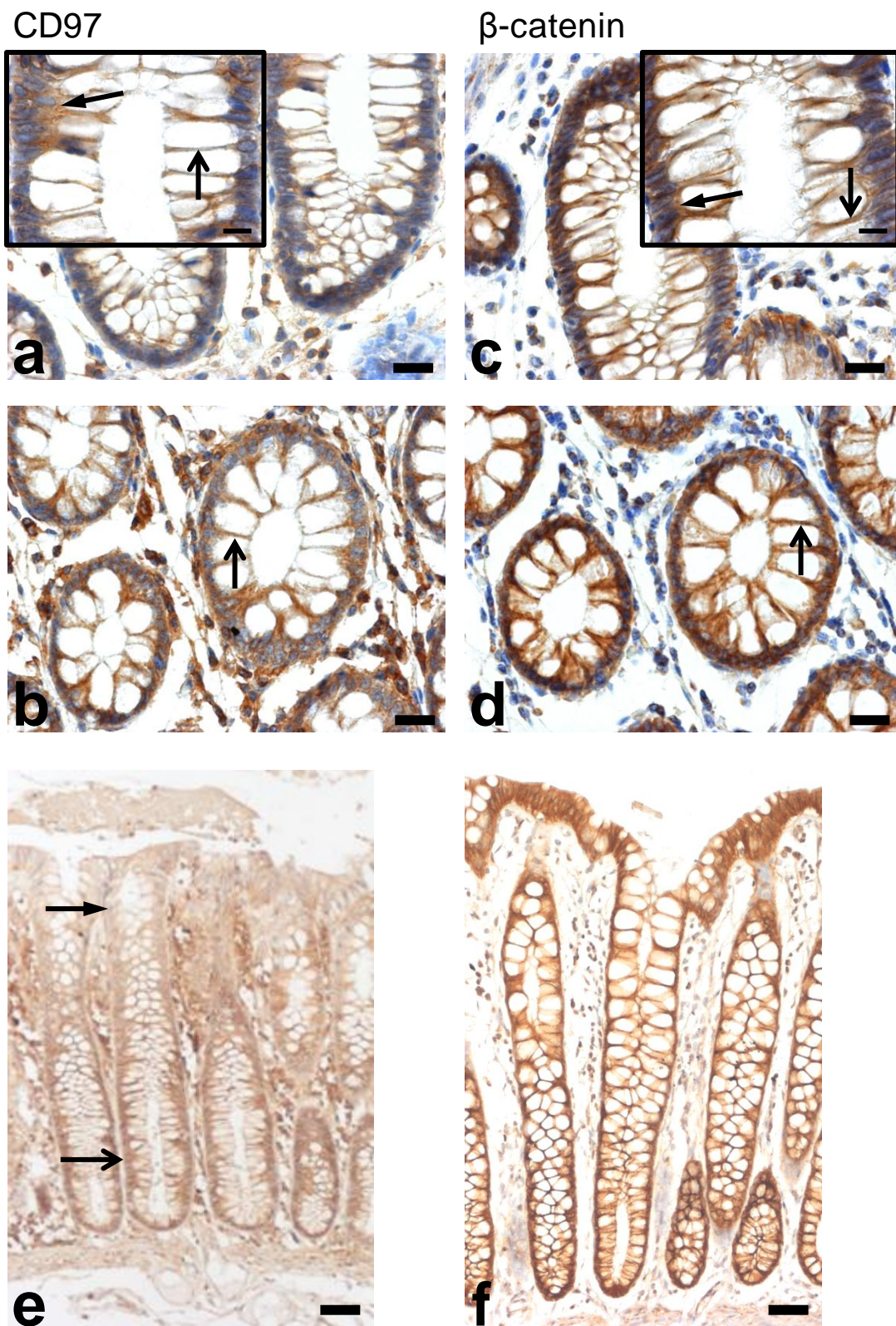


Abbildung 14: Expression von CD97 und β -catenin im kolorektalen Normalgewebe

a, b CD97 ist in den lateralen Zellkontakten (offene Pfeile), sowie im Zytoplasma (geschlossener Pfeil) der Enterozyten lokalisiert. c, d β -catenin ist stark in den lateralen Zellkontakten (offene Pfeile) und mäßig im Zytoplasma (geschlossener Pfeil) der Enterozyten exprimiert. e Abnehmender Expressionsgradient von CD97 von der Kryptenbasis (offener Pfeil) zum Kryptenlumen (geschlossener Pfeil) hin. f β -catenin wird gleichmäßig in der gesamten Krypte exprimiert. Maßstabsbalken: a,b,c,d 20 μ m; Detail a, Detail b 10 μ m; e,f 50 μ m.

5.3 Expression von CD97 und β -catenin im kolorektalem Karzinom

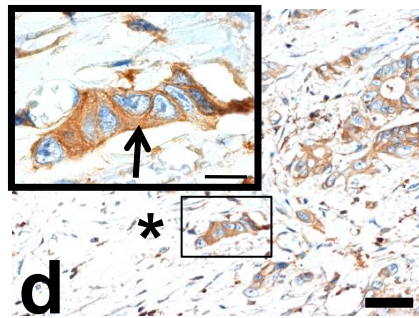
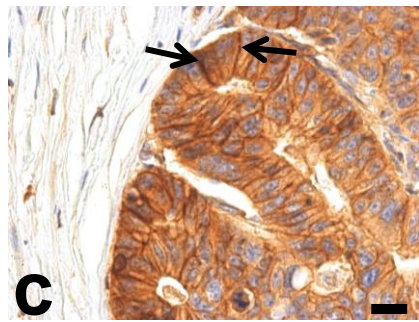
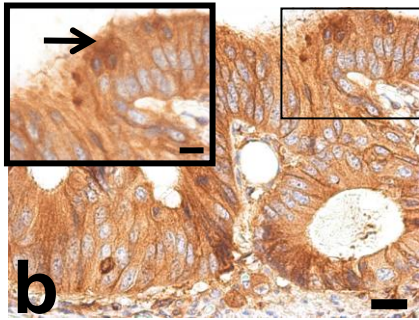
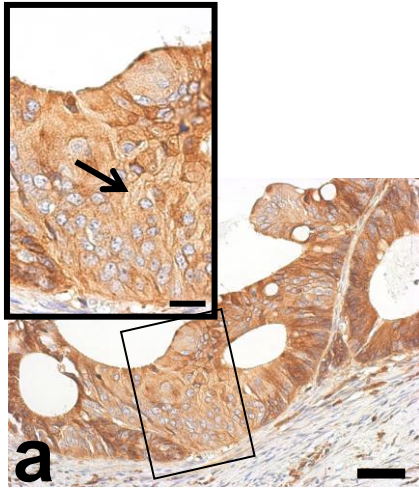
Alle kolorektalen Karzinome exprimieren CD97. In den Karzinomzellen ist CD97, ähnlich wie in den normalen Enterozyten, in den lateralen Zellkontakten lokalisiert (Färbescore, Mittelwert \pm SEM: 2.39 ± 0.18 , Tab. 7). In 103/111 der Karzinome ist die Expression von CD97 in den lateralen Zellkontakten im Vergleich zum Normalgewebe signifikant vermindert (Tab. 7, Abb. 12 und 15 a). Es gibt auch einzelne Tumore (8/111), bei denen es im Vergleich zum Normalgewebe zu einer stärkeren Expression von CD97 in den lateralen Zellkontakten kommt (Abb. 15 c). Auch in den kolorektalen Karzinomen ist CD97 im Zytoplasma lokalisiert (6.57 ± 0.15 , Tab. 7). In 92/111 Fällen kommt es zu einer signifikant stärkeren Expression von CD97 im Zytoplasma der Tumorzellen als in Zellen des kolorektalen Normalgewebes (Tab. 7, Abb. 12 und 15 b, d). CD97 ist nie in den Zellkernen der malignen Enterozyten zu finden (Tab. 7, Abb. 12). Für die Expression von CD97 ist somit zusammenfassend zu sagen, dass es im Vergleich von Normal- zu Tumorgewebe zu einer Änderung der Lokalisation von CD97 von den lateralen Zellkontakten in das Zytoplasma kommt (Tab. 7, Abb. 12).

β -catenin wird in allen kolorektalen Karzinomen exprimiert. In den meisten Karzinomen (102/111) nimmt der Färbescore von β -catenin im Bereich der lateralen Zellkontakte im Vergleich zu denen der normalen Enterozyten ab (Tab. 8, Abb. 13 und 15 g). Es gibt einzelne Karzinome (9/111), bei denen es in den lateralen Zellkontakten im Vergleich zum Normalgewebe zu einer stärkeren Expression von β -catenin kommt (Abb. 15 e). In 87/111 Karzinomen kommt es zu einer Zunahme der Expression von β -catenin im Zytoplasma der Tumorzellen im Vergleich zu den Enterozyten des Normalgewebes (Tab. 8, Abb. 13 und 15 f, g). Eine Akkumulation von β -catenin in den Zellkernen der Tumorzellen konnte in 67 von 111 Fällen nachgewiesen werden (Tab. 8, Abb. 13 und 15 f, h). Somit ist für die Expression von β -catenin zusammenfassend zu sagen, dass es im Vergleich von Normalgewebe zu Tumorgewebe zu einer Translokation von β -catenin von den lateralen Zellkontakten in das Zytoplasma und in den Zellkern kommt (Tab. 8, Abb. 13).

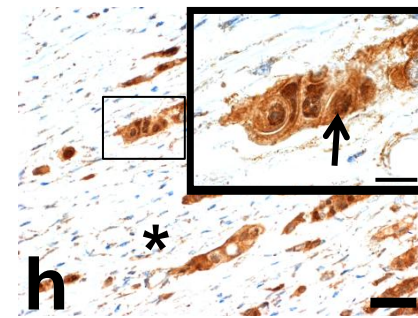
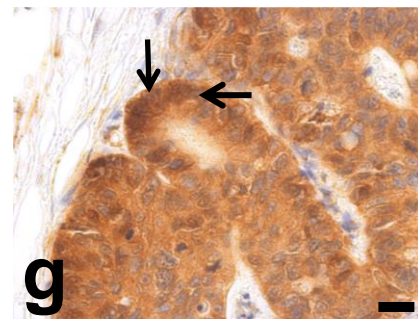
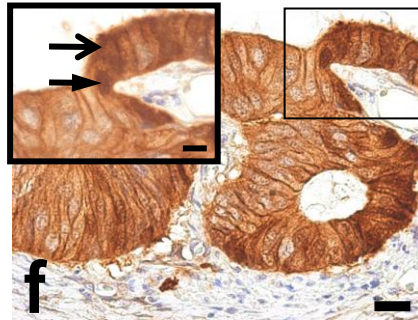
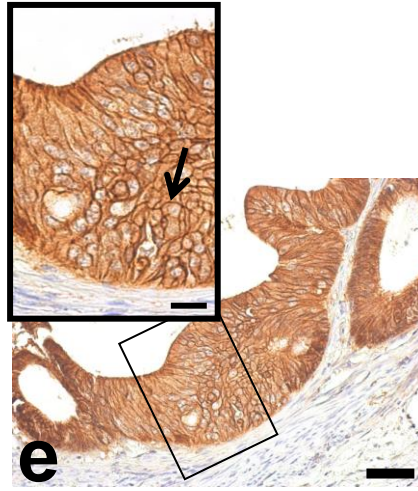
5.3.1 Kolokalisation von CD97 und β -catenin

Zum Nachweis einer möglichen Kolokalisation von CD97 und β -catenin in kolorektalen Karzinomzellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Kolokalisation beider Proteine in den lateralen Zellkontakten der Karzinomzellen (Abb. 15 k). Auch in den Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sich eine starke Expression von CD97 im Zytoplasma (Abb. 15 i, k). β -catenin ist ebenfalls im Zytoplasma sowie in den Zellkernen exprimiert (Abb. 15 j, k). Eine Kolokalisation beider Proteine im Zytoplasma ist in den untersuchten kolorektalen Karzinomen nicht nachzuweisen.

CD97



β -catenin



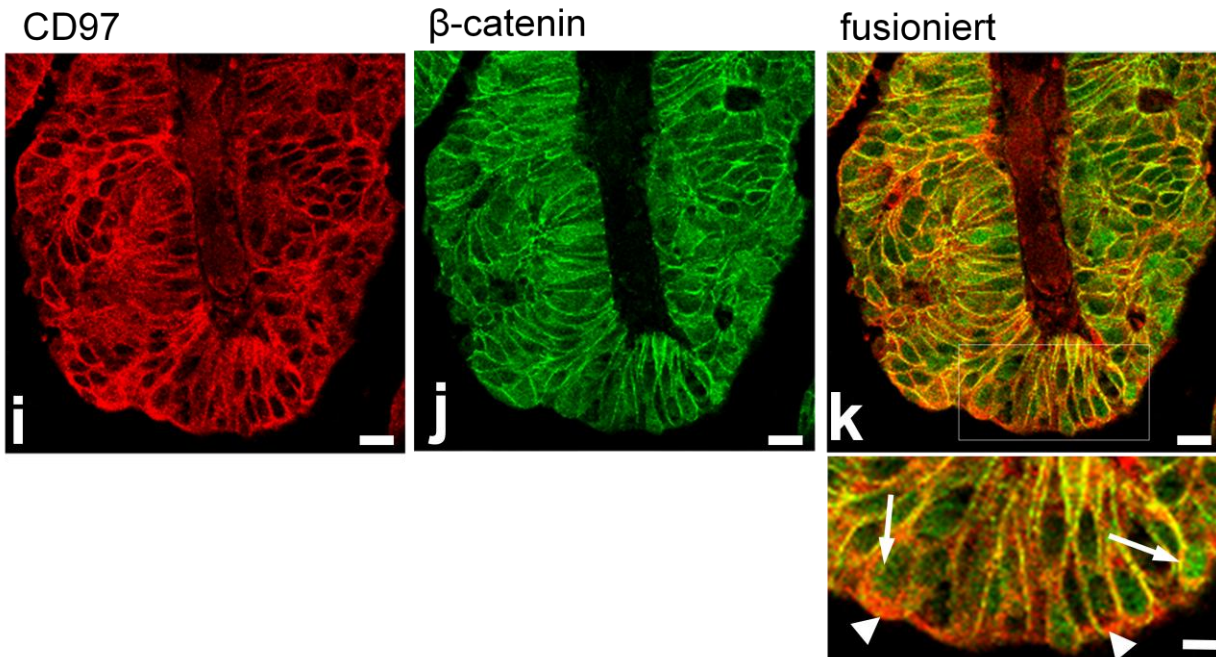


Abbildung 15: Expression von CD97 und β -catenin im kolorektalen Karzinomgewebe

a, e In diesem Karzinom zeigt sich eine schwache Expression von CD97 im Bereich der lateralen Zellkontakte, wohingegen β -catenin stark in diesen Zell-Zellkontakten exprimiert wird (Pfeil). In der Übersicht ist zu erkennen, dass es Bereiche sowohl mit stärkerer als auch mit schwächerer Expression von CD97 im Zytoplasma gibt. Im Vergleich dazu ist die Expression von β -catenin im Zytoplasma der Tumorzellen relativ homogen. b, f In einigen Teilen dieses kolorektalen Karzinoms ist sowohl CD97 als auch β -catenin sehr stark im Zytoplasma exprimiert (offener Pfeil). Zudem kommt es in diesen Bereichen zu einer Translokation von β -catenin in den Zellkern (geschlossener Pfeil). c, g In wenigen Karzinomen kommt es auch zu einer vergleichsweise starken Expression von CD97 in den lateralen Zellkontakten (Pfeile). Hier ist CD97 ebenfalls im Zytoplasma zu finden. Im Gegensatz dazu ist β -catenin vorwiegend im Zytoplasma und in den Zellkernen stark exprimiert (Pfeile). d, h In den *scattered* Tumorzellen vor der Invasionsfront des Tumors (Stern) kommt es zu einer starken Expression von CD97 im Zytoplasma (Pfeil). β -catenin ist in den *scattered* Tumorzellen im Zytoplasma und stark in den Zellkernen exprimiert (Pfeil). i, j, k Immunfluoreszenzfärbung eines kolorektalen Karzinoms. CD97 ist rot und β -catenin grün dargestellt. CD97 und β -catenin sind in den lateralen Zellkontakten kolokalisiert. Im Detail des Fusionsbildes ist zu erkennen, dass CD97 in einigen Tumorzellen stark im Zytoplasma exprimiert wird (Pfeilköpfe) und β -catenin in den Zellkernen lokalisiert ist (Pfeile). Maßstabsbalken: a,e,d,h 50 μ m; b,f,c,g,i,j,k, Detail a, Detail e 20 μ m; Detail b, Detail d, Detail f. Detail h 10 μ m; Detail k 5 μ m.

5.3.2 Expression von CD97 und β -catenin in *scattered* Tumorzellen

Es gibt 61/111 Fälle in den in Paraffin eingebetteten Proben, in denen *scattered* Tumorzellen im histologischen Präparat vorhanden sind. Im Vergleich der zellulären Kompartimente (laterale Zellkontakte bzw. Zytoplasma) zueinander lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen *scattered* Tumorzellen und Zellen im Karzinomzentrum in Bezug auf die Expression von CD97 feststellen. Die Zellkerne der *scattered* Tumorzellen sind CD97-negativ (Tab. 9).

Tabelle 9: Expression von CD97 in *scattered* Tumorzellen im Vergleich zu Zellen im Karzinomzentrum, n=61

Zellkompartiment	Färbescore <i>scattered</i> Tumorzellen (Mittelwert ± SEM)	Färbescore Karzinomzentrum (Mittelwert ± SEM)	p-Wert
CD97, laterale Zellkontakte	2.11 ± 0.26	2.23 ± 0.19	0.219
CD97, Zytoplasma	6.79 ± 0.26	6.66 ± 0.19	0.450
CD97, Zellkern	0	0	-

Im Vergleich zu Zellen die im Tumorzentrum lokalisiert sind, kommt es in den *scattered* Tumorzellen zu einer verminderten Expression von β -catenin in den lateralen Zellkontakten sowie zu einer stärkeren Expression im Zytoplasma und in den Zellkernen (alle $p < 0.0001^*$; Tab. 10 und Abb. 15 h).

Tabelle 10: Expression von β -catenin in *scattered* Tumorzellen im Vergleich zu Zellen im Karzinomzentrum, n=61

Zellkompartiment	Färbescore <i>scattered</i> Tumorzellen (Mittelwert ± SEM)	Färbescore Karzinomzentrum (Mittelwert ± SEM)	p-Wert
β -catenin, laterale Zellkontakte	2.75 ± 0.33	4.05 ± 0.34	< 0.0001*
β -catenin, Zytoplasma	8.62 ± 0.31	7.02 ± 0.20	< 0.0001*
β -catenin, Zellkern	6.28 ± 0.62	1.43 ± 0.25	< 0.0001*

5.4 Lokalisation von CD97 und β -catenin in der kolorektalen Tumorgenese

Die Färbescores von CD97 und β -catenin in den lateralen Zellkontakten der normalen Enterozyten korrelieren signifikant miteinander ($r = 0.574$, $p < 0.0001^*$, Tab. 11). Je stärker CD97 in den lateralen Zellkontakten der Zellen des Normalgewebes exprimiert ist, desto stärker ist dort auch die Expression von β -catenin.

Betrachtet man die kolorektalen Tumorzellen zeigt sich: je stärker die Expression von β -catenin in den Zellkernen der malignen Enterozyten ist, desto stärker ist β -catenin im Zytoplasma ($r = 0.392$, $p < 0.0001^*$, Tab. 11) und desto schwächer in den lateralen Zellkontakten der Karzinomzellen exprimiert ($r = -0.414$, $p < 0.0001^*$, Tab. 11).

Die Stärke der Expression von CD97 und β -catenin im Zytoplasma der Tumorzellen korreliert miteinander ($r = 0.481$, $p < 0.0001^*$, Tab. 11, Abb. 15 b, f). Wohingegen die Expression von CD97 im Zytoplasma und die Lokalisation von β -catenin im Zellkern der Tumorzellen keine Korrelation aufweist ($r = 0.146$, $p = 0.127$, Tab. 11).

Am interessantesten ist jedoch, dass sich die Expression von CD97 und β -catenin in den lateralen Zellkontakten der malignen Enterozyten im Vergleich zum Normalgewebe simultan vermindert ($p = 0.017^*$, Tab. 12) und gleichzeitig eine parallele Zunahme der Expression beider Moleküle im Zytoplasma der Tumorzellen erfolgt ($p = 0.005^*$, Tab. 12).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass es in der kolorektalen Tumorgenese bei CD97 und β -catenin zu einer Änderung der Lokalisation von den lateralen Zellkontakten in die Zelle kommt (Abb. 12, 13 und 15). Während β -catenin daraufhin im Zytoplasma und den Zellkernen der Tumorzellen erscheint, ist die neu auftretende verstärkte Expression von CD97 auf das Zytoplasma der Tumorzellen beschränkt.

Tabelle 11: Korrelationen der Färbescores von CD97 und β -catenin in den verschiedenen Zellkompartimenten im kolorektalen Normal- und Karzinomgewebe, $n=111$

		r	p-Wert
Normalgewebe	CD97lat:CD97zyto	0.275	0.004*
	β catlat: β catzyto	0.426	< 0.0001*
	CD97lat: β catlat	0.574	< 0.0001*
	CD97lat: β catzyto	0.204	0.032*
	CD97zyto: β catlat	0.189	0.047*
	CD97zyto: β catzyto	-0.040	0.676
	Tumor	CD97lat:CD97zyto	-0.044
	β catlat: β catzyto	0.002	0.986
	β catlat: β catzk	-0.414	< 0.0001*
	β catzyto: β catzk	0.392	< 0.0001*
	CD97lat: β catlat	0.154	0.106
	CD97lat: β catzyto	0.206	0.030*
	CD97lat: β catzk	0.113	0.236
	CD97zyto: β catlat	0.070	0.466
	CD97zyto: β catzyto	0.481	< 0.0001*
	CD97zyto: β catzk	0.146	0.127

Abk.: r = Spearman'scher Korrelationskoeffizient, CD97lat = Färbescore: CD97 in lateralen Zellkontakten, CD97zyto = Färbescore: CD97 im Zytoplasma, β catlat = Färbescore: β -catenin in lateralen Zellkontakten, β catzyto = Färbescore: β -catenin im Zytoplasma, β catzk = Färbescore: β -catenin im Zellkern.

Tabelle 12: Zusammenhang der Änderung der Lokalisation von CD97 und β -catenin im Vergleich Normalgewebe zu Tumor, n=111

		NG→TM: β catlat ↓		p-Wert
		Nein	Ja	
NG→TM: CD97lat ↓	Nein	3	5	0.017*
	Ja	6	97	
NG→TM: β catzyto ↑				
NG→TM: CD97lat ↓	Nein	0	8	0.197
	Ja	24	79	
NG→TM: β catzk ↑				
NG→TM: CD97lat ↓	Nein	3	5	1.000
	Ja	41	62	
NG→TM: CD97zyto ↑				
NG→TM: CD97lat ↓	Nein	3	5	0.136
	Ja	16	87	
NG→TM: β catlat ↓				
NG→TM: CD97zyto ↑	Nein	2	17	0.650
	Ja	7	85	
NG→TM: β catzyto ↑				
NG→TM: CD97zyto ↑	Nein	9	10	0.005*
	Ja	15	77	
NG→TM: β catzk ↑				
NG→TM: CD97zyto ↑	Nein	9	10	0.454
	Ja	35	57	
NG→TM: CD97zyto ↑				
NG→TM: β catlat ↓	Nein	2	7	1.000
	Ja	22	80	
NG→TM: β catzk ↑				
NG→TM: β catlat ↓	Nein	5	4	0.479
	Ja	39	63	
NG→TM: β catzk ↑				
NG→TM: β catzyto ↑	Nein	16	8	0.004*
	Ja	28	59	

Abk.: NG→TM: CD97lat ↓ = Verminderung der Expression von CD97 in lateralen Zellkontakten im Vergleich von Normal- zu Tumorzellen, NG→TM: CD97zyto ↑ = Zunahme der Expression von CD97 im Zytoplasma im Vergleich von Normal- zu Tumorzellen, NG→TM: β catlat ↓ = Verminderung der Expression von β -catenin in lateralen Zellkontakten im Vergleich von Normal- zu Tumorzellen, NG→TM: β catzyto ↑ = Zunahme der Expression von β -catenin im Zytoplasma im Vergleich von Normal- zu Tumorzellen, NG→TM: β catzk ↑ = Zunahme der Expression von β -catenin im Zellkern im Vergleich von Normal- zu Tumorzellen.

5.5 Expression von CD97 und β -catenin und klinische Parameter

Die Änderung der Lokalisation von CD97 von den lateralen Zellkontakten in das Zytoplasma bei kolorektalen Tumorzellen ist bei 92/111 Fällen unseres Patientenkollektivs nachzuweisen. Dieses Phänomen geht mit einem erhöhten Auftreten von *scattered* Tumorzellen/*tumor budding* einher (p = 0.041*, Tab. 15). Es gab keinen Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster von CD97 und Alter, Geschlecht, Lokalisation des Tumors, WHO-Stadium, Tumorgroße, Vorhandensein von Lymphknoten- oder Fernmetastasen, Differenzierung sowie histologischer Blut- und Lymphgefäßinvasion (Tab. 14 und 15).

Tabelle 14: Zusammenhang zwischen dem Verlust von CD97 aus den lateralen Zellkontakten in kolorektalen Tumorzellen und klinischen Parametern, n=111

	Verlust von CD97 aus lateralen Zellkontakten in CC	Kein Verlust von CD97 aus lateralen Zellkontakten in CC	p-Wert
Anzahl	103 (92.8%)	8 (7.2%)	
Alter (Mittelwert \pm SD)	68.6 \pm 11.1	72.6 \pm 6.1	
<70	47	2	0.462
\geq 70	56	6	
Geschlecht			
männlich	40	3	1.000
weiblich	63	5	
Lokalisation			
Kolon	90	8	0.593
Rektum	13	0	
WHO-Tumorstadium			
I oder II	46	4	1.000
III oder IV	57	4	
Tumorgröße (pT)			
1 oder 2	16	0	0.600
3 oder 4	87	8	
Lymphknotenbefall (pN)			
0	48	4	1.000
1 oder 2	55	4	
Fernmetastasierung (pM)			
0	84	7	1.000
1	19	1	
Metastasiertes Stadium (LK u./o. Fernmetastasen)			
0	45	4	0.730
1	58	4	
Differenzierung (Grading)			
G1 oder G2 (gut)	73	5	0.693
G3 oder G4 (schlecht)	30	3	
Blutgefäßinvasion (V)			
V0	83	6	0.657
V1	20	2	
Lymphgefäßinvasion (L)			
L0	77	8	0.194
L1	26	0	
<i>tumor budding</i>			
nicht vorhanden/schwach	45	5	0.464
mäßig/stark	58	3	

Tabelle 15: Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen Lokalisation von CD97 in kolorektalen Tumorzellen und klinischen Parametern, n=111

	Auftreten von CD97 im Zytoplasma in CC	Kein Auftreten von CD97 im Zytoplasma in CC	p-Wert
Anzahl	92 (82.9%)	19 (17.1%)	
Alter (Mittelwert \pm SD)	69.23 \pm 10.4	67.47 \pm 13.0	
<70	42	7	0.614
\geq 70	50	12	
Geschlecht			
männlich	38	5	0.303
weiblich	54	14	
Lokalisation			
Kolon	81	17	1.000
Rektum	11	2	
WHO-Tumorstadium			
I oder II	40	10	0.613
III oder IV	52	9	
Tumorgröße (pT)			
1 oder 2	15	1	0.298
3 oder 4	77	18	
Lymphknotenbefall (pN)			
0	42	10	0.621
1 oder 2	50	9	
Fernmetastasierung (pM)			
0	74	17	0.517
1	18	2	
Metastasiertes Stadium (LK u./o. Fernmetastasen)			
0	40	9	0.803
1	52	10	
Differenzierung (Grading)			
G1 oder G2 (gut)	65	13	1.000
G3 oder G4 (schlecht)	27	6	
Blutgefäßinvasion (V)			
V0	74	15	1.000
V1	18	4	
Lymphgefäßinvasion (L)			
L0	69	16	0.555
L1	23	3	
<i>tumor budding</i>			
nicht vorhanden/schwach	37	13	0.041*
mäßig/stark	55	6	

Im Gegensatz dazu führen der Verlust von β -catenin aus den lateralen Zellkontakten, sowie das Auftreten von β -catenin im Zellkern zu einem signifikant höherem Auftreten von diesen *scattered* Tumorzellen/*tumor budding* ($p = 0.010^*$ bzw. $p = 0.020^*$, Tab. 16 und 18). Interessanterweise zeigt sich, dass kolorektale Karzinome mit einer Translokation von β -catenin in das Zytoplasma der Tumorzellen besser differenziert sind als kolorektale Karzinome ohne eine erhöhte Expression von β -catenin im Zytoplasma ($p = 0.022^*$, Tab. 17).

Tabelle 16: Zusammenhang zwischen dem Verlust von β -catenin aus den lateralen Zellkontakten in kolorektalen Tumorzellen und klinischen Parametern, n=111

	Verlust von β-cat aus lateralen Zellkontakten in CC	Kein Verlust von β-cat aus lateralen Zellkontakten in CC	p-Wert
Anzahl	102 (91.9%)	9 (8.1%)	
Alter (Mittelwert \pm SD)	68.9 \pm 11.2	69.8 \pm 7.1	
<70	44	5	0.505
\geq 70	58	4	
Geschlecht			
männlich	41	2	0.478
weiblich	61	7	
Lokalisation			
Kolon	89	9	0.595
Rektum	13	0	
WHO-Tumorstadium			
I oder II	45	5	0.729
III oder IV	57	4	
Tumorgröße (pT)			
1 oder 2	15	1	1.000
3 oder 4	87	8	
Lymphknotenbefall (pN)			
0	47	5	0.732
1 oder 2	55	4	
Fernmetastasierung (pM)			
0	83	8	1.000
1	19	1	
Metastasiertes Stadium (LK u./o. Fernmetastasen)			
0	44	5	0.505
1	58	4	
Differenzierung (Grading)			
G1 oder G2 (gut)	73	5	0.447
G3 oder G4 (schlecht)	29	4	
Blutgefäßinvasion (V)			
V0	80	9	0.200
V1	22	0	
Lymphgefäßinvasion (L)			
L0	76	9	0.113
L1	26	0	
<i>tumor budding</i>			
nicht vorhanden/schwach	42	8	0.010*
mäßig/stark	60	1	

Tabelle 17: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von β -catenin im Zytoplasma von kolorektalen Tumorzellen und klinischen Parametern, n=111

	Auftreten von β-cat im Zytoplasma in CC	Kein Auftreten von β-cat im Zytoplasma in CC	p-Wert
Anzahl	87 (78.4%)	24 (21.6%)	
Alter (Mittelwert \pm SD)	68.7 \pm 10.5	69.7 \pm 12.4	
<70	40	9	0.495
\geq 70	47	15	
Geschlecht			
männlich	32	11	0.481
weiblich	55	13	
Lokalisation			
Kolon	76	22	0.730
Rektum	11	2	
WHO-Tumorstadium			
I oder II	40	10	0.818
III oder IV	47	14	
Tumorgröße (pT)			
1 oder 2	15	1	0.186
3 oder 4	72	23	
Lymphknotenbefall (pN)			
0	41	11	1.000
1 oder 2	46	13	
Fernmetastasierung (pM)			
0	72	19	0.765
1	15	5	
Metastasiertes Stadium (LK u./o. Fernmetastasen)			
0	39	10	0.820
1	48	14	
Differenzierung (Grading)			
G1 oder G2 (gut)	66	12	0.022*
G3 oder G4 (schlecht)	21	12	
Blutgefäßinvasion (V)			
V0	71	18	0.564
V1	16	6	
Lymphgefäßinvasion (L)			
L0	69	16	0.275
L1	18	8	
<i>tumor budding</i>			
nicht vorhanden/schwach	38	12	0.647
mäßig/stark	49	12	

Tabelle 18: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von β -catenin im Zellkern von kolorektalen Tumorzellen und klinischen Parametern, n=111

	Auftreten von β -cat im Zellkern in CC	Kein Auftreten von β -cat im Zellkern in CC	p-Wert
Anzahl	67 (60.4%)	44 (39.6%)	
Alter (Mittelwert \pm SD)	67.0 \pm 11.6	71.9 \pm 8.9	
<70	33	16	0.241
\geq 70	34	28	
Geschlecht			
männlich	27	16	0.696
weiblich	40	28	
Lokalisation			
Kolon	58	40	0.560
Rektum	9	4	
WHO-Tumorstadium			
I oder II	31	19	0.846
III oder IV	36	25	
Tumorgröße (pT)			
1 oder 2	10	6	1.000
3 oder 4	57	38	
Lymphknotenbefall (pN)			
0	31	21	1.000
1 oder 2	36	23	
Fernmetastasierung (pM)			
0	56	35	0.620
1	11	9	
Metastasiertes Stadium (LK u./o. Fernmetastasen)			
0	30	19	1.000
1	37	25	
Differenzierung (Grading)			
G1 oder G2 (gut)	51	27	0.137
G3 oder G4 (schlecht)	16	17	
Blutgefäßinvasion (V)			
V0	53	36	0.811
V1	14	8	
Lymphgefäßinvasion (L)			
L0	49	36	0.362
L1	18	8	
<i>tumor budding</i>			
nicht vorhanden/schwach	24	26	0.020*
mäßig/stark	43	18	

In 57 von 111 Fällen kommt es zu einer simultanen Änderung der Lokalisation von CD97 in das Zytoplasma der Karzinomzellen und dem Auftreten von β -catenin im Zellkern. In diesen Fällen finden sich signifikant mehr *scattered* Tumorzellen/*tumor budding* ($p = 0.013^*$, Tab. 24). Bei 85 der 111 Fälle finden sich eine simultane Änderung der Lokalisation von CD97 in das Zytoplasma der Karzinomzellen und der Verlust von β -catenin aus den lateralen Zell-Zellkontakten. Auch bei diesen Fällen sind signifikant mehr *scattered* Tumorzellen/*tumor budding* nachzuweisen ($p = 0.001^*$, Tab. 22).

Interessanterweise finden sich bei den Fällen mit simultanem Verlust von CD97 aus den lateralen Zellkontakten und dem Auftreten von β -catenin im Zytoplasma bzw. im Zellkern der kolorektalen Tumorzellen signifikant kleinere (pT1 oder pT2) und besser differenzierte Karzinome (G1 oder G2) ($p = 0.036^*$ und $p = 0.021^*$, Tab. 20 bzw. $p = 0.036^*$ und $p = 0.021^*$, Tab. 21).

Tabelle 19: Zusammenhang zwischen dem gleichzeitigen Verlust von CD97 und β -catenin aus den lateralen Zellkontakten von kolorektalen Tumorzellen und klinischen Parametern, n=111

	Verlust von CD97 und β-cat aus lateralen Zellkontakten in CC	Kein Verlust von CD97 und β-cat aus lateralen Zellkontakten in CC	p-Wert
Anzahl	97 (87.4%)	14 (12.6%)	
Alter (Mittelwert \pm SD)	68.5 \pm 11.3	71.6 \pm 7.1	
<70	43	6	1.000
\geq 70	54	8	
Geschlecht			
männlich	38	5	1.000
weiblich	59	9	
Lokalisation			
Kolon	84	14	0.366
Rektum	13	0	
WHO-Tumorstadium			
I oder II	43	7	0.777
III oder IV	54	7	
Tumorgröße (pT)			
1 oder 2	15	1	0.688
3 oder 4	82	13	
Lymphknotenbefall (pN)			
0	45	7	1.000
1 oder 2	52	7	
Fernmetastasierung (pM)			
0	78	13	0.458
1	19	1	
Metastasiertes Stadium (LK u./o. Fernmetastasen)			
0	42	7	0.775
1	55	7	
Differenzierung (Grading)			
G1 oder G2 (gut)	69	9	0.755
G3 oder G4 (schlecht)	28	5	
Blutgefäßinvasion (V)			
V0	77	12	0.732
V1	20	2	
Lymphgefäßinvasion (L)			
L0	71	14	0.037*
L1	26	0	
<i>tumor budding</i>			
nicht vorhanden/schwach	40	10	0.045*
mäßig/stark	57	4	

Tabelle 20: Zusammenhang zwischen dem gleichzeitigen Verlust von CD97 aus den lateralen Zellkontakten und dem Auftreten von β -catenin im Zytoplasma von kolorektalen Tumorzellen und klinischen Parametern, n=111

	Verlust von CD97 aus lateralen Zellkontakten und Auftreten von β-cat im Zytoplasma in CC	Kein Verlust von CD97 aus lateralen Zellkontakten und Auftreten von β-cat im Zytoplasma in CC	p-Wert
Anzahl	79 (71.2%)	32 (28.8%)	
Alter (Mittelwert \pm SD)	68.3 \pm 10.7	70.4 \pm 11.2	
<70	38	11	0.211
\geq 70	41	21	
Geschlecht			
männlich	29	14	0.524
weiblich	50	18	
Lokalisation			
Kolon	68	30	0.341
Rektum	11	2	
WHO-Tumorstadium			
I oder II	36	14	1.000
III oder IV	43	18	
Tumorgröße (pT)			
1 oder 2	15	1	0.036*
3 oder 4	64	31	
Lymphknotenbefall (pN)			
0	37	15	1.000
1 oder 2	42	17	
Fernmetastasierung (pM)			
0	65	26	1.000
1	14	6	
Metastasiertes Stadium (LK u./o. Fernmetastasen)			
0	35	14	1.000
1	44	18	
Differenzierung (Grading)			
G1 oder G2 (gut)	61	17	0.021*
G3 oder G4 (schlecht)	18	15	
Blutgefäßinvasion (V)			
V0	65	24	0.434
V1	14	8	
Lymphgefäßinvasion (L)			
L0	61	24	0.808
L1	18	8	
<i>tumor budding</i>			
nicht vorhanden/schwach	33	17	0.299
mäßig/stark	46	15	

Tabelle 21: Zusammenhang zwischen dem gleichzeitigen Verlust von CD97 aus den lateralen Zellkontakten und dem Auftreten von β -catenin im Zellkern von kolorektalen Tumorzellen und klinischen Parametern, n=111

	Verlust von CD97 aus lateralen Zellkontakten und Auftreten von β-cat im Zellkern in CC	Kein Verlust von CD97 aus lateralen Zellkontakten und Auftreten von β-cat im Zellkern in CC	p-Wert
Anzahl	79 (71.2%)	32 (28.8%)	
Alter (Mittelwert \pm SD)	68.3 \pm 10.7	70.4 \pm 11.2	
<70	38	11	0.211
\geq 70	41	21	
Geschlecht			
männlich	29	14	0.524
weiblich	50	18	
Lokalisation			
Kolon	68	30	0.341
Rektum	11	2	
WHO-Tumorstadium			
I oder II	36	14	1.000
III oder IV	43	18	
Tumorgröße (pT)			
1 oder 2	15	1	0.036*
3 oder 4	64	31	
Lymphknotenbefall (pN)			
0	37	15	1.000
1 oder 2	42	17	
Fernmetastasierung (pM)			
0	65	26	1.000
1	14	6	
Metastasiertes Stadium (LK u./o. Fernmetastasen)			
0	35	14	1.000
1	44	18	
Differenzierung (Grading)			
G1 oder G2 (gut)	61	17	0.021*
G3 oder G4 (schlecht)	18	15	
Blutgefäßinvasion (V)			
V0	65	24	0.434
V1	14	8	
Lymphgefäßinvasion (L)			
L0	61	24	0.808
L1	18	8	
<i>tumor budding</i>			
nicht vorhanden/schwach	33	17	0.299
mäßig/stark	46	15	

Tabelle 22: Zusammenhang zwischen der gleichzeitigen Änderung der Lokalisation von CD97 in das Zytoplasma und dem Verlust von β -catenin aus den lateralen Zellkontakten von kolorektalen Tumorzellen und klinischen Parametern, n=111

	Auftreten von CD97 im Zytoplasma und Verlust von β-cat aus lateralen Zellkontakten in CC	Kein Auftreten von CD97 im Zytoplasma und Verlust von β-cat aus lateralen Zellkontakten in CC	p-Wert
Anzahl	85 (76.6%)	26 (23.4%)	
Alter (Mittelwert \pm SD)	69.2 \pm 10.6	68.0 \pm 11.7	
<70	37	12	0.825
\geq 70	48	14	
Geschlecht			
männlich	36	7	0.176
weiblich	49	19	
Lokalisation			
Kolon	74	24	0.729
Rektum	11	2	
WHO-Tumorstadium			
I oder II	37	13	0.654
III oder IV	48	13	
Tumorgröße (pT)			
1 oder 2	14	2	0.351
3 oder 4	71	24	
Lymphknotenbefall (pN)			
0	39	13	0.823
1 oder 2	46	13	
Fernmetastasierung (pM)			
0	68	23	0.251
1	17	3	
Metastasiertes Stadium (LK u./o. Fernmetastasen)			
0	37	12	0.825
1	48	14	
Differenzierung (Grading)			
G1 oder G2 (gut)	61	17	0.625
G3 oder G4 (schlecht)	24	9	
Blutgefäßinvasion (V)			
V0	67	22	0.588
V1	18	4	
Lymphgefäßinvasion (L)			
L0	62	23	0.120
L1	23	3	
<i>tumor budding</i>			
nicht vorhanden/schwach	31	19	0.001*
mäßig/stark	54	7	

Tabelle 23: Zusammenhang zwischen der gleichzeitigen Änderung der Lokalisation von CD97 und β -catenin in das Zytoplasma von kolorektalen Tumorzellen und klinischen Parametern, n=111

	Auftreten von CD97 und β-cat im Zytoplasma in CC	Kein Auftreten von CD97 und β-cat im Zytoplasma in CC	p-Wert
Anzahl	77 (69.4%)	34 (30.6%)	
Alter (Mittelwert \pm SD)	68.5 \pm 10.2	69.9 \pm 12.2	
<70	37	12	0.300
\geq 70	40	22	
Geschlecht			
männlich	32	11	0.404
weiblich	45	23	
Lokalisation			
Kolon	67	31	0.751
Rektum	10	3	
WHO-Tumorstadium			
I oder II	33	17	0.538
III oder IV	44	17	
Tumorgröße (pT)			
1 oder 2	14	2	0.141
3 oder 4	63	32	
Lymphknotenbefall (pN)			
0	35	17	0.685
1 oder 2	42	17	
Fernmetastasierung (pM)			
0	63	28	1.000
1	14	6	
Metastasiertes Stadium (LK u./o. Fernmetastasen)			
0	33	16	0.685
1	44	18	
Differenzierung (Grading)			
G1 oder G2 (gut)	58	20	0.114
G3 oder G4 (schlecht)	19	14	
Blutgefäßinvasion (V)			
V0	63	26	0.607
V1	14	8	
Lymphgefäßinvasion (L)			
L0	60	25	0.633
L1	17	9	
<i>tumor budding</i>			
nicht vorhanden/schwach	31	19	0.150
mäßig/stark	46	15	

Tabelle 24: Zusammenhang zwischen der gleichzeitigen Änderung der Lokalisation von CD97 in das Zytoplasma und dem Auftreten von β -catenin im Zellkern von kolorektalen Tumorzellen und klinischen Parametern, n=111

	Auftreten von CD97 im Zytoplasma und β- cat im Zellkern in CC	Kein Auftreten von CD97 im Zyto- plasma und β-cat im Zellkern in CC	p-Wert
Anzahl	57 (51,4%)	54 (48,6%)	
Alter (Mittelwert \pm SD)	67.6 \pm 11.2	70.3 \pm 10.4	
<70	28	21	0.340
\geq 70	29	33	
Geschlecht			
männlich	25	18	0.330
weiblich	32	36	
Lokalisation			
Kolon	49	49	0.559
Rektum	8	5	
WHO-Tumorstadium			
I oder II	26	24	1.000
III oder IV	31	30	
Tumorgröße (pT)			
1 oder 2	10	6	0.422
3 oder 4	47	48	
Lymphknotenbefall (pN)			
0	27	25	1.000
1 oder 2	30	29	
Fernmetastasierung (pM)			
0	47	44	1.000
1	10	10	
Metastasiertes Stadium (LK u./o. Fernmetastasen)			
0	26	23	0.849
1	31	31	
Differenzierung (Grading)			
G1 oder G2 (gut)	43	35	0.299
G3 oder G4 (schlecht)	14	19	
Blutgefäßinvasion (V)			
V0	46	43	1.000
V1	11	11	
Lymphgefäßinvasion (L)			
L0	41	44	0.268
L1	16	10	
<i>tumor budding</i>			
nicht vorhanden/schwach	19	31	0.013*
mäßig/stark	38	23	

6. Diskussion

6.1 Neue immunhistochemische Färbemethode und Auswahl der Antikörper

Erstes Ziel war es eine immunhistochemische Färbemethode zu etablieren, mit der der Adhäsions-GPCR CD97 in Paraffin-eingebetteten humanen kolorektalen Geweben dargestellt werden kann. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen und etablierten immunhistochemischen Färbemethode konnten wir nun zum ersten Mal parallel die Expression von CD97 mit der Expression von β -catenin in einem Kollektiv kolorektaler Karzinome und deren korrespondierenden Normalgeweben immunhistochemisch untersuchen. In kolorektalen Karzinomen konnte CD97 bisher nur im Kryostat-Schnitt immunhistochemisch dargestellt werden [141], wohingegen der immunhistochemische Nachweis der nukleären Expression von β -catenin nur im Paraffinschnitt möglich ist [74, 75].

Um mit der neuen immunhistochemischen Färbemethode über einen langen Zeitraum stabile Färbeergebnisse zu erhalten und somit die Expression von CD97 in den einzelnen Gewebeproben valide miteinander vergleichen zu können, spielte die Auswahl geeigneter Primär-Antikörper eine entscheidende Rolle. Es wurden mehrere kommerziell verfügbare CD97-Antikörper getestet. Letztendlich entsprach nur der CD97_AK6 diesen Anforderungen. Die übrigen untersuchten CD97-Antikörper zeigten entweder eine unspezifische Markierung von CD97 (CD97_AK1), eine im Verlauf zunehmende Aktivitätsabnahme (CD97_AK2 und -3) oder erkannten CD97 gar nicht (CD97_AK4) bzw. nicht im Paraffinschnitt (CD97_AK5). Für β -catenin war mit dem β -catenin_AK1 ein stabiler und zuverlässiger Antikörper für die Immunhistochemie vorhanden.

6.2 Nachweis von CD97 in Kryostat- und Paraffin-eingebetteten Geweben

Nach Etablierung der neuen immunhistochemischen Färbemethode und der Auswahl der geeigneten Antikörper wurde zuerst evaluiert, ob sich die Ergebnisse der immunhistochemischen Darstellung von CD97 in Kryo-konservierten kolorektalen Geweben [141] in Paraffin-eingebetteten Proben reproduzieren lassen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in den Kryostat-Schnitten von Steinert et al. lässt sich CD97 in allen in Paraffin-eingebetteten Proben des Normalgewebes nachweisen. CD97 ist in normalen kolorektalen Zellen in den lateralen Zellkontakten, aber auch im Zytoplasma lokalisiert.

Wir konnten zeigen, dass es zu Änderungen der Lokalisation von CD97 innerhalb der maligne transformierten Zellen kommt. In den kolorektalen Karzinomzellen zeigten sich eine signifikante Steigerung der Expression von CD97 im Zytoplasma und eine Abnahme der Expression von CD97 im Bereich der lateralen Zellkontakte. Bei Steinert et al. zeigte sich eine Zunahme der Expression von CD97 in kolorektalen Karzinomzellen. Bei diesem Vergleich der Ergebnisse dieser Studie und der Arbeit von Steinert et al. ist zu beachten, dass wir in der hier vorliegenden Studie die einzelnen Zellkompartimente (laterale Zellkontakte, Zytoplasma und Zellkern) getrennt voneinander betrachtet haben. Dies erlaubte uns eine detailliertere Untersuchung der Expression von CD97 und zeigte, dass es im Zytoplasma der maligne transformierten kolorektalen Zellen zu einer Zunahme der Expression von CD97 kommt, parallel aber eine verminderte Expression von CD97 in den lateralen Zellkontakten dieser Zellen nachzuweisen ist.

Bei 61 von 111 Gewebeproben kommen vor der Invasionsfront des Tumors isoliert liegende Zellen, sogenannte *scattered* Tumorzellen vor. Dieses Phänomen wird auch als *tumor budding* bezeichnet. Allerdings gibt es keinen signifikanten Unterschied der Expression von CD97 in diesen *scattered* Tumorzellen im Vergleich zu Zellen im Zentrum des jeweiligen Karzinoms. In den Kryostat-Schnitten von Steinert et al. zeigte sich hingegen eine höhere Expression von CD97 in genau diesen *scattered* Tumorzellen im Vergleich zu Zellen im Tumorzentrum. Da es in dieser Studie keinen signifikanten Unterschied der Expression von CD97 zwischen den *scattered* Tumorzellen und Karzinomzellen im

Tumorzentrum gibt, konnten wir keine Zusammenhänge in Bezug auf die klinischen Parameter herstellen. Daher lässt sich das Ergebnis von *Steinert et al.*, dass Karzinome mit einer erhöhten Expression von CD97 in den *scattered* Tumorzellen ein höheres Tumorstadium und eine erhöhte Lymphgefäßinvasion gegenüber Karzinomen mit uniformen Färbeverhalten von CD97 aufweisen, hier nicht bestätigen.

Die aufgeführten Unterschiede der immunhistochemischen Ergebnisse dieser Studie und der Untersuchung von Steinert et al. lassen sich möglicherweise darauf zurückführen, dass die Gewebe in dieser Studie in Paraffin eingebettet worden sind, während bei Steinert et al. gefrorene Kryostat-Schnitte verwendet wurden. Durch die Einbettung in Paraffin und der anschließenden Fixierung lässt sich die Gewebearchitektur besser erhalten und speichern als bei Gefrierschnitten. Es ist jedoch zu beachten, dass bei den Fixierungsprozessen während der Einbettung in Paraffin manche Antigene verändert bzw. zerstört werden und sich somit der Markierung während der Immunhistochemie entziehen könnten. Deswegen wurde in dieser Studie ein Antigen-Retrieval durchgeführt, um die Epitope die durch die Fixierungsprozesse verloren gegangen sind, zurückzugewinnen. Als klassisches Beispiel für enorme Unterschiede im Färbeergebnis zwischen Kryostat-Schnitten und in Paraffin eingebetteten Geweben ist β -catenin zu nennen. Die nukleäre Akkumulation von β -catenin in kolorektalen Karzinomzellen ist nur in Paraffin-eingebetteten Geweben nicht aber in Kryostat-Schnitten immunhistochemisch nachzuweisen [75]. Eine weitere mögliche Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Verwendung verschiedener CD97 Antikörper sein. In dieser Arbeit wurde der HPA013707-Antikörper (Tab. 3) verwendet. Es handelt sich um einen polyklonalen Antikörper der gegen das *Precursor recombinant protein epitope signature tag (PrEST)* im N-terminalen Fragment von CD97 gerichtet ist. In der Arbeit von Steinert et al. wurde der monoklonale CLB-CD97/3-Antikörper benutzt. CLB-CD97/3 erkennt die GAIN-Domäne von CD97 (früher *stalk region*). CLB-CD97/3 funktioniert nicht in Paraffin-eingebetteten kolorektalen Geweben. Möglicherweise ist das Epitop durch die Fixierungsprozesse der Einbettung in Paraffin verborgen und somit für den monoklonalen Antikörper nicht zugänglich. Letztendlich erkennen die in beiden Untersuchungen verwendeten CD97 Antikörper unterschiedliche Epitope von CD97, was sich somit in unterschiedlichen Färbeergebnissen widerspiegeln kann.

6.3 Lokalisation von CD97 und β -catenin im kolorektalem Karzinom

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Funktion von CD97 in normalen intestinalen Epithelzellen in transgenen Mäusen untersucht. Im Gegensatz zu humanen Enterozyten ist CD97 in murinen Enterozyten gar nicht bzw. nur schwach exprimiert [152]. Eine Überexpression von CD97 in normalen intestinalen Epithelzellen von diesen transgenen Mäusen führt zur Akkumulation von nicht-phosphoryliertem membrangebundenem β -catenin in *adherens junctions*, wodurch diese Zellkontakte stabilisiert werden und die Tiere im Modell der DSS-induzierten Kolitis kaum erkranken [139]. In dieser Arbeit konnten wir in humanen kolorektalen Epithelzellen einen Expressionsgradienten von CD97 entlang der Krypt-Villus-Achse, mit starker Expression im Kryptenbereich und schwächerer Expression in apikalen Bereichen, zeigen. Passend dazu wird nicht-phosphoryliertes membrangebundenes β -catenin in Kryptengrund-nahen Enterozyten stärker exprimiert als in luminalen Enterozyten [147]. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine wahrscheinliche Interaktion von CD97 und nicht-phosphoryliertem membrangebundenem β -catenin. Ebenfalls passend zum hier gezeigten Expressionsgradienten von CD97 entlang der Krypt-Villus-Achse und der Regeneration der Enterozyten aus Kryptengrund-nahen undifferenzierten intestinalen Stammzellen konnte zuletzt gezeigt werden, dass der Vorgang der Apoptose durch CD97 inhibiert wird [148]. Hier konnten wir nachweisen, dass in weiter luminal gelegenen Enterozyten die Expression von CD97 abnimmt. Diese Beobachtung harmoniert mit der Tatsache, dass apoptotische Zelluntergänge, im Sinne der Homöostase der intestinalen Selbsterneuerung, in diesen Enterozyten zunehmen [108]. Dieses pro-apoptotische Verhalten von CD97 könnte eine wichtige Rolle beim Überleben von Tumorzellen spielen.

Nun war zu klären, ob und wie sich die Lokalisation von CD97 und β -catenin in der kolorektalen Karzinomzelle im Vergleich zur normalen Zelle verändert. CD97 und β -catenin werden sowohl in benignen als auch in malignen humanen kolorektalen Zellen exprimiert. Dabei kommt es simultan zu

charakteristischen Änderungen der Lokalisation beider Moleküle. In humanen kolorektalen Normalgeweben sind CD97 und β -catenin in den lateralen Zell-Zellkontakten kolokalisiert. In den malignen Zellen kommt es dann zu einer simultanen Verminderung der Expression beider Moleküle in den lateralen Zell-Zellkontakten und gleichzeitig zu einer parallelen Zunahme der Expression von CD97 und β -catenin im Zytoplasma. Nur β -catenin erscheint dann in den kolorektalen Karzinomzellen im Zellkern. Dieses simultane Auftreten von CD97 im Zytoplasma und von β -catenin im Zellkern maligner kolorektaler Zellen korreliert mit dem Auftreten von *scattered* Tumorzellen. Es wird davon ausgegangen, dass diese *scattered* Tumorzellen Karzinomzellen darstellen, die eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen haben und somit wesentlich an der Progression epithelialer Tumore beteiligt sind. Die *scattered* Tumorzellen, auch als *tumor buds* bezeichnet, besitzen hypo-proliferative [150] und apoptotische Eigenschaften [151]. In Übereinstimmung dazu konnte zuletzt gezeigt werden, dass CD97 apoptotische Vorgänge in Tumorzellen inhibiert [148]. Steinert et al. zeigte eine Überexpression von CD97 in genau diesen *scattered* Tumorzellen [141]. Diese Beobachtung und dass β -catenin ebenfalls in diesen *scattered* Tumorzellen verstärkt im Zellkern lokalisiert ist [145], implizierte, dass CD97 ein direktes β -catenin/Tcf-Zielgen im fehlregulierten Wnt-Signalweg ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in kolorektalen Karzinom-Zelllinien mit induzierbarem dominant-negativen Tcf die CD97 mRNA-Level nicht durch Tcf beeinflusst werden. Die CD97-Promotor-Aktivität wird nicht durch Ko-Expression von Wildtyp oder S33A mutiertem β -catenin mit Tcf-4 gesteigert. CD97 ist somit kein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges [146].

Kürzlich konnten wir in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass CD97 und β -catenin in den lateralen Zell-Zellkontakten miteinander interagieren. Dies konnte sowohl in kultivierten kolorektalen Tumorzellen als auch in kolorektalen Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Mittels des *proximity ligation assay* (PLA) wurden innerhalb der Zell-Zellkontakte in benignen und malignen Zellen die meisten Interaktionspunkte von CD97 und β -catenin nachgewiesen. Passend dazu ko-immunpräzipitiert CD97 β -catenin in DLD-1-Zellen und transgenen (Tg-villin-CD97) Zellen und umgekehrt. Diese Ko-Immunitäzitation von CD97 und β -catenin konnte mittels *GST-pulldown* bestätigt werden. Obwohl sich wie hier gezeigt die Expression von CD97 und β -catenin in den lateralen Zell-Zellkontakten simultan vermindert und es sich gleichzeitig eine parallele Zunahme der Expression von CD97 und β -catenin im Zytoplasma zeigt, kommt es zu keiner nachweisbaren Interaktion beider Moleküle im Zytoplasma. Passend dazu konnte auch nur in den lateralen Zellkontakten eine Kolokalisation beider Moleküle in der Immunfluoreszenz gezeigt werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CD97 weder die Lokalisation noch die Expression von β -catenin beeinflusst.

Wie beschrieben stabilisiert CD97 die lateralen Zell-Zellkontakte im normalen Epithelgewebe. Im Gegensatz dazu steht die Funktion von CD97 in malignen Geweben. Die Expression von CD97 korreliert mit dem Vermögen von kolorektalen Tumorzelllinien zur Serum-induzierten Migration und Invasion [141]. Die Serumkomponente Lysophosphatidsäure (LPS) induziert Zellmigration durch eine Dämpfung der LPS-Rezeptor Signaltransduktion über G α 12/13 und RhoA auf das Zytoskelett durch eine Interaktion mit CD97 [143]. Für diese durch CD97 verstärkte Zellmigration ist das vollständige CD97-Molekül notwendig, eine Verkürzung der TM7-*domain* auf eine TM2-*domain* verhindert die verstärkte Migration [149]. Wie unlängst gezeigt, verhindert diese Verkürzung des CTF von CD97 ebenfalls die Interaktion von CD97 und β -catenin.

Noch ist unklar, ob die beiden Funktionen von CD97, Zelladhäsion und Regulation der Migration von Tumorzellen, miteinander im Zusammenhang stehen. Die Reduktion von CD97 in den lateralen Zell-Zellkontakten führt zum Auftreten von CD97 im Zytoplasma. Interessanterweise konnte in unserer Arbeitsgruppe kürzlich gezeigt werden dass, CD97 nach Zerstörung dieser Zell-Zellkontakte schneller im Zytoplasma erscheint als β -catenin. Dieser Fakt spricht mehr für eine Translokation als für eine Akkumulation bzw. Hinderung des Transports von CD97 zur Zellmembran in Tumorzellen. Es konnte auch gezeigt werden, dass nach dem Erscheinen von CD97 im Zytoplasma die Kolokalisation und somit auch die Interaktion mit β -catenin nicht mehr nachweisbar ist. Somit stimuliert CD97 nicht die β -catenin-abhängige TCF-vermittelte Aktivität von Transkriptionsfaktoren und es kommt nicht zur Aktivierung von Genen, die Proteine kodieren, welche u.a. die kolorektale Karzinogenese stimulieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CD97 ein multifunktionales Protein ist, das über eine Interaktion mit β -catenin in *adherens junctions* in normalen Epithelzellen die Zell-Zelladhäsion reguliert und andererseits über eine Interaktion mit dem LPS-Rezeptor eine wichtige Rolle in Signaltransduktionswegen in Karzinomzellen spielt.

7. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Der Adhäsions-GPCR CD97 interagiert in *adherens junctions* mit β -catenin

eingereicht von:

Norman Dietrich

angefertigt in:

Universität Leipzig

Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Forschungslabore

Liebigstraße 19,
04103 Leipzig; Germany

betreut von:

Prof. rer. nat. Gabriela Aust

Eingereicht im Februar 2017

CD97 ist ein *G protein-coupled receptor* der zu der Gruppe der Adhäsions-GPCRs zuzuordnen ist. CD97 ist im normalen humanen Darmepithel in lateralen Zellkontakten lokalisiert. In transgenen Mäusen, die CD97 selektiv in normalen intestinalen Epithelzellen überexprimieren, werden die *adherens junctions* durch Stabilisierung des nicht-phosphorylierten membran-gebundenen β -catenins verstärkt. Neben der Epithelzellverband-stabilisierenden Funktion von β -catenin in *adherens junctions* spielt β -catenin im Zellkern als Aktivator von Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle in der kolorektalen Karzinogenese. Diese unterschiedliche zelluläre Verteilung wird über den kanonischen Wnt-Signalweg reguliert. CD97 wird in kolorektalen Karzinomen hochreguliert. Steinert et al. beschrieben, dass insbesondere sogenannte *scattered* Tumorzellen an der Invasionsfront des kolorektalen Karzinoms CD97 im Vergleich zu Zellen im Tumorzentrum höher exprimieren. Dieses Phänomen geht mit einem höheren Tumorstadium und verstärkter Lymphgefäßinvasion einher. In diesen Zellen wird β -catenin verstärkt im Zytoplasma und im Zellkern exprimiert. Die histologische Lokalisation von CD97 im kolorektalen Normal- und Karzinomgewebe ließ zunächst vermuten, dass CD97 ein direktes β -catenin/Tcf-Zielgen im fehlregulierten Wnt-Signalweg ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass CD97 kein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges ist.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal eine immunhistochemische Studie durchgeführt, die die Lokalisation von CD97 und β -catenin in normalem und malignem kolorektalem Gewebe parallel vergleichend analysiert.

Bisher konnte CD97 nur im Kryostat-Schnitt immunhistochemisch dargestellt werden. Die immunhistochemische Darstellung der nukleären Expression von β -catenin ist jedoch nur in Paraffin-eingebetteten Geweben möglich. Somit etablierten wir erstmals eine immunhistochemische Färbemethode, die es erlaubt CD97 in Paraffin-eingebetteten humanen kolorektalen Geweben darzustellen. CD97 wird in allen Schnitten des kolorektalen Normalgewebes exprimiert. Sowohl CD97 als auch β -catenin sind dabei vorwiegend in den lateralen Zellkontakten aber auch im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Die Färbescores von CD97 und β -catenin in den lateralen Zellkontakten der normalen Enterozyten korrelieren signifikant miteinander. In kolorektalen Karzinomen verschwinden dann beide Moleküle simultan aus diesen lateralen Zellkontakten. Während β -catenin daraufhin im Zytoplasma und den Zellkernen der Karzinomzellen erscheint, ist die neu auftretende verstärkte Expression von CD97 auf das Zytoplasma der Karzinomzellen beschränkt. Dieses simultane Auftreten von CD97 im Zytoplasma und von β -catenin im Zellkern maligner kolorektaler Zellen korreliert mit dem Auftreten von *scattered* Tumorzellen. Die *scattered* Tumorzellen, auch als *tumor buds* bezeichnet, besitzen hypo-proliferative und apoptotische Eigenschaften.

Diese *scattered* Tumorzellen an der Invasionsfront der kolorektalen Karzinome unseres Kollektivs exprimieren CD97 jedoch nicht stärker als Zellen im Karzinomzentrum. β -catenin hingegen wird in diesen *scattered* Tumorzellen vermehrt im Zytoplasma und in den Zellkernen exprimiert. Die Unterschiede der Färbeergebnisse im Vergleich zur Arbeit von Steinert et al. sind zum einen auf die Verwendung von Paraffin- statt Kryostat-Schnitten in unserer Studie und zum anderen auf die Nutzung verschiedener Antikörper gegen CD97, die unterschiedliche Epitope erkennen, zurückzuführen.

Wir konnten einen Expressionsgradienten von CD97 entlang der Krypt-Villus-Achse, mit starker Expression im Kryptenbereich und schwächerer Expression in apikalen Bereichen, zeigen. Passend dazu wird nicht-phosphoryliertes membrangebundenes β -catenin in Kryptengrund-nahen Enterozyten stärker exprimiert. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine wahrscheinliche Interaktion von CD97 und nicht-phosphoryliertem membrangebundenem β -catenin. Ebenfalls passend zum hier gezeigten Expressionsgradienten von CD97 entlang der Krypt-Villus-Achse und der Regeneration der Enterozyten aus Kryptengrund-nahen undifferenzierten intestinalen Stammzellen konnte zuletzt gezeigt werden, dass der Vorgang der Apoptose durch CD97 inhibiert wird. Hier konnten wir nachweisen, dass in weiter luminal gelegenen Enterozyten die Expression von CD97 abnimmt. Diese Beobachtung harmoniert mit der Tatsache, dass apoptotische Zelluntergänge, im Sinne der Homöostase der intestinalen Selbsterneuerung, in diesen Enterozyten zunehmen. Dieses apoptotische Verhalten von CD97 könnte eine wichtige Rolle beim Überleben von Tumorzellen spielen.

Kürzlich konnten wir in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass CD97 und β -catenin in den lateralen Zell-Zellkontakten miteinander interagieren. Passend dazu ko-immunpräzipitiert CD97 β -catenin in DLD-1-Zellen und transgenen (Tg-villin-CD97) Zellen und umgekehrt. Obwohl sich wie hier gezeigt die Expression von CD97 und β -catenin in den lateralen Zell-Zellkontakten simultan vermindert und es sich gleichzeitig eine parallele Zunahme der Expression von CD97 und β -catenin im Zytoplasma zeigt, kommt es zu keiner nachweisbaren Interaktion beider Moleküle im Zytoplasma. Passend dazu konnte auch nur in den lateralen Zellkontakten eine Kolokalisation beider Moleküle in der Immunfluoreszenz gezeigt werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CD97 weder die Lokalisation noch die Expression von β -catenin beeinflusst.

Wie beschrieben stabilisiert CD97 die lateralen Zell-Zellkontakte im normalen Epithelgewebe. Im Gegensatz dazu steht die Funktion von CD97 in malignen Geweben. Die Expression von CD97 korreliert mit dem Vermögen von kolorektalen Tumorzelllinien zur Serum-induzierten Migration und Invasion. Die Serumkomponente Lysophosphatidsäure (LPS) induziert Zellmigration durch eine Dämpfung der LPS-Rezeptor Signaltransduktion über $G\alpha_{12/13}$ und RhoA auf das Zytoskelett durch eine Interaktion mit CD97. Für diese durch CD97 verstärkte Zellmigration ist das vollständige CD97-Molekül notwendig. Wie unlängst gezeigt, verhindert die Verkürzung des CTF von CD97 ebenfalls die Interaktion von CD97 und β -catenin.

Noch ist unklar, ob die beiden Funktionen von CD97, Zelladhäsion und Regulation der Migration von Tumorzellen, miteinander im Zusammenhang stehen. Die Reduktion von CD97 in den lateralen Zell-

Zellkontakten führt zum Auftreten von CD97 im Zytoplasma. Interessanterweise konnte zuletzt in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass CD97 nach Zerstörung dieser Zell-Zellkontakte schneller im Zytoplasma erscheint als β -catenin. Dieser Fakt spricht mehr für eine Translokation als für eine Akkumulation bzw. Hinderung des Transports von CD97 zur Zellmembran in Tumorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass nach dem Erscheinen von CD97 im Zytoplasma die Kolo-kalisation und somit auch die Interaktion mit β -catenin nicht mehr nachweisbar ist. Somit stimuliert CD97 nicht die β -catenin-abhängige TCF-vermittelte Aktivität von Transkriptionsfaktoren und es kommt nicht zur Aktivierung von Genen, die Proteine kodieren, welche u.a. die kolorektale Karzinogenese stimulieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CD97 ein multifunktionales Protein ist, dass über eine Interaktion mit β -catenin in *adherens junctions* in normalen Epithelzellen die Zell-Zelladhäsion reguliert und andererseits über eine Interaktion mit dem LPS-Rezeptor eine wichtige Rolle in Signaltransduktionswegen in Karzinomzellen spielt.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Amin N, Vincan E, The Wnt signaling pathways and cell adhesion. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jan 1;17:784-804.
- [2] Niessen CM, Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*. 2007 Nov;127(11):2525-32.
- [3] Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Jung A, Kirchner T, Brabletz T, Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions during cancer progression. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2007;91:21-8.
- [4] Barker N, Clevers H, Tumor environment: a potent driving force in colorectal cancer? *Trends Mol Med*. 2001 Dec;7(12):535-7.
- [5] Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K, Yasuda K, Takeichi M, Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature*. 1987 Sep 24-30;329(6137):341-3.
- [6] Onder TT(1), Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA, Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*. 2008 May 15;68(10):3645-54. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2938.
- [7] Cox RT, Kirkpatrick C, Peifer M, Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Biol*. 1996 Jul;134(1):133-48.
- [8] Fagotto F, Glück U, Gumbiner BM, Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol*. 1998 Feb 12;8(4):181-90.
- [9] Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W, Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 1996 Aug 15;382(6592):638-42.
- [10] Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H, XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*. 1996 Aug 9;86(3):391-9.
- [11] Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H, Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1784-7.
- [12] Bienz M, Clevers H, Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):311-20.
- [13] Ozawa M, Kemler R, The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *J Cell Biol*. 1998 Sep 21;142(6):1605-13.
- [14] van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, van Roy F, Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 6;96(14):7980-5.
- [15] Daniel JM, Reynolds AB, The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol*. 1999 May;19(5):3614-23.
- [16] Noren NK, Liu BP, Burrige K, Kreft B, p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol*. 2000 Aug 7;150(3):567-80.
- [17] Hirano S, Kimoto N, Shimoyama Y, Hirohashi S, Takeichi M, Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell*. 1992 Jul 24;70(2):293-301.
- [18] Benjamin JM, Nelson WJ, Bench to bedside and back again: molecular mechanisms of alpha-catenin function and roles in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*. 2008 Feb;18(1):53-64.

- [19] El-Bahrawy M, Talbot I, Poulosom R, Alison M, Variable nuclear localization of alpha-catenin in colorectal carcinoma. *Lab Invest.* 2002 Sep;82(9):1167-74.
- [20] Silvis MR, Kreger BT, Lien WH, Klezovitch O, Rudakova GM, Camargo FD, Lantz DM, Seykora JT, Vasioukhin V, α -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci Signal.* 2011 May 24;4(174):ra33. doi: 10.1126/scisignal.2001823.
- [21] Marie H, Pratt SJ, Betson M, Epple H, Kittler JT, Meek L, Moss SJ, Troyanovsky S, Attwell D, Longmore GD, Braga VM, The LIM protein Ajuba is recruited to cadherin-dependent cell junctions through an association with alpha-catenin. *J Biol Chem.* 2003 Jan 10;278(2):1220-8.
- [22] Kanungo J, Pratt SJ, Marie H, Longmore GD, Ajuba, a cytosolic LIM protein, shuttles into the nucleus and affects embryonal cell proliferation and fate decisions. *Mol Biol Cell.* 2000 Oct;11(10):3299-313.
- [23] Nix DA, Fradelizi J, Bockholt S, Menichi B, Louvard D, Friederich E, Beckerle MC, Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus. *J Biol Chem.* 2001 Sep 14;276(37):34759-67.
- [24] Mariner DJ, Wang J, Reynolds AB, ARVCF localizes to the nucleus and adherens junction and is mutually exclusive with p120(ctn) in E-cadherin complexes. *J Cell Sci.* 2000 Apr;113 (Pt 8):1481-90.
- [25] Calkins CC, Hoepner BL, Law CM, Novak MR, Setzer SV, Hatzfeld M, Kowalczyk AP, The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein. *J Biol Chem.* 2003 Jan 17;278(3):1774-83.
- [26] Wolf A, Keil R, Götzl O, Mun A, Schwarze K, Lederer M, Hüttelmaier S, Hatzfeld M, The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nat Cell Biol.* 2006 Dec;8(12):1432-40.
- [27] Keil R, Wolf A, Hüttelmaier S, Hatzfeld M, Beyond regulation of cell adhesion: local control of RhoA at the cleavage furrow by the p0071 catenin. *Cell Cycle.* 2007 Jan 15;6(2):122-7.
- [28] Heid HW, Schmidt A, Zimbelmann R, Schäfer S, Winter-Simanowski S, Stumpp S, Keith M, Figge U, Schnölzer M, Franke WW, Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation.* 1994 Dec;58(2):113-31.
- [29] South AP, Wan H, Stone MG, Dopping-Hepenstal PJ, Purkis PE, Marshall JF, Leigh IM, Eady RA, Hart IR, McGrath JA, Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. *J Cell Sci.* 2003 Aug 15;116(Pt 16):3303-14.
- [30] Hofmann I, Casella M, Schnölzer M, Schlechter T, Spring H, Franke WW, Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA-binding proteins and the recruitment of plakophilins 1 and 3 to stress granules. *Mol Biol Cell.* 2006 Mar;17(3):1388-98.
- [31] Wolf A, Krause-Gruszczynska M, Birkenmeier O, Ostareck-Lederer A, Hüttelmaier S, Hatzfeld M, Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity. *J Cell Biol.* 2010 Feb 22;188(4):463-71. doi: 10.1083/jcb.200908135.
- [32] Hatzfeld M, A nuclear function for plakophilin-1 in the DNA damage response? *J Invest Dermatol.* 2010 Nov;130(11):2538-40. doi: 10.1038/jid.2010.258.
- [33] Mertens C, Kuhn C, Franke WW, Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol.* 1996 Nov;135(4):1009-25.
- [34] Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ, Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling. *J Biol Chem.* 2002 Mar 22;277(12):10512-22.

- [35] Mertens C, Hofmann I, Wang Z, Teichmann M, Sepehri Chong S, Schnölzer M, Franke WW, Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 3;98(14):7795-800.
- [36] Kowalczyk AP, Borgwardt JE, Green KJ, Analysis of desmosomal cadherin-adhesive function and stoichiometry of desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Invest Dermatol*. 1996 Sep;107(3):293-300.
- [37] Khan K, Hardy R, Haq A, Ogunbiyi O, Morton D, Chidgey M, Desmocollin switching in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2006 Nov 20;95(10):1367-70.
- [38] Kolegraff K, Nava P, Helms MN, Parkos CA, Nusrat A, Loss of desmocollin-2 confers a tumorigenic phenotype to colonic epithelial cells through activation of Akt/ β -catenin signaling. *Mol Biol Cell*. 2011 Apr 15;22(8):1121-34. doi: 10.1091/mbc.E10-10-0845.
- [39] Ben-Ze'ev A, Geiger B, Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Oct;10(5):629-39.
- [40] Kemler R, From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet*. 1993 Sep;9(9):317-21.
- [41] Kolligs FT, Kolligs B, Hajra KM, Hu G, Tani M, Cho KR, Fearon ER, γ -catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes Dev*. 2000 Jun 1;14(11):1319-31.
- [42] Macara IG, Par proteins: partners in polarization. *Curr Biol*. 2004 Feb 17;14(4):R160-2.
- [43] Macara IG, Spang A, Closing the GAP between polarity and vesicle transport. *Cell*. 2006 May 5;125(3):419-21.
- [44] Fang L, Wang Y, Du D, Yang G, Tak Kwok T, Kai Kong S, Chen B, Chen DJ, Chen Z, Cell polarity protein Par3 complexes with DNA-PK via Ku70 and regulates DNA double-strand break repair. *Cell Res*. 2007 Feb;17(2):100-16.
- [45] Mitic LL, Anderson JM, Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:121-42.
- [46] Matter K, Balda MS, Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *J Cell Sci*. 2007 May 1;120(Pt 9):1505-11.
- [47] Huerta M, Muñoz R, Tapia R, Soto-Reyes E, Ramírez L, Recillas-Targa F, González-Mariscal L, López-Bayghen E, Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Mol Biol Cell*. 2007 Dec;18(12):4826-36.
- [48] Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Huerta M, Lopez-Bayghen E, The tight junction protein ZO-2 blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 expression. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 May;1165:121-5. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04024.x.
- [49] Balda MS, Matter K, The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J*. 2000 May 2;19(9):2024-33.
- [50] Balda MS, Garrett MD, Matter K, The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol*. 2003 Feb 3;160(3):423-32.
- [51] Nie M, Aijaz S, Leefa Chong San IV, Balda MS, Matter K, The Y-box factor ZONAB/DbpA associates with GEF-H1/Lfc and mediates Rho-stimulated transcription. *EMBO Rep*. 2009 Oct;10(10):1125-31. doi: 10.1038/embor.2009.182.
- [52] Buchert M, Darido C, Lagerqvist E, Sedello A, Cazevieille C, Buchholz F, Bourgaux JF, Pannequin J, Joubert D, Hollande F, The symplekin/ZONAB complex inhibits intestinal cell differentiation by the repression of AML1/Runx1. *Gastroenterology*. 2009 Jul;137(1):156-64, 164.e1-3. doi: 10.1053/j.gastro.2009.03.037.
- [53] Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S, Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*. 2005 Dec 19;171(6):939-45.

- [54] Mariano C, Palmela I, Pereira P, Fernandes A, Falcão AS, Cardoso FL, Vaz AR, Campos AR, Gonçalves-Ferreira A, Kim KS, Brites D, Brito MA, Tricellulin expression in brain endothelial and neural cells. *Cell Tissue Res.* 2013 Mar;351(3):397-407. doi: 10.1007/s00441-012-1529-y.
- [55] Keon BH, Schäfer S, Kuhn C, Grund C, Franke WW, Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol.* 1996 Aug;134(4):1003-18.
- [56] Takagaki Y, Manley JL, Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component. *Mol Cell Biol.* 2000 Mar;20(5):1515-25.
- [57] Hofmann I, Schnölzer M, Kaufmann I, Franke WW, Symplekin, a constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Biol Cell.* 2002 May;13(5):1665-76.
- [58] Nakamura T, Blechman J, Tada S, Rozovskaia T, Itoyama T, Bullrich F, Mazo A, Croce CM, Geiger B, Canaani E, huASH1 protein, a putative transcription factor encoded by a human homologue of the *Drosophila* ash1 gene, localizes to both nuclei and cell-cell tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20;97(13):7284-9.
- [59] Beisel C, Imhof A, Greene J, Kremmer E, Sauer F, Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature.* 2002 Oct 24;419(6909):857-62.
- [60] Balda MS, Matter K, Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 2003 Jun;13(6):310-8.
- [61] Dobrosotskaya I, Guy RK, James GL, MAGI-1, a membrane-associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein-protein interaction domains. *J Biol Chem.* 1997 Dec 12;272(50):31589-97.
- [62] Zeng L, Fagotto F, Zhang T, Hsu W, Vasicek TJ, Perry WL 3rd, Lee JJ, Tilghman SM, Gumbiner BM, Costantini F, The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell.* 1997 Jul 11;90(1):181-92.
- [63] Behrens J, Jerchow BA, Würtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kühl M, Wedlich D, Birchmeier W, Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science.* 1998 Apr 24;280(5363):596-9.
- [64] Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P, Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol.* 1998 May 7;8(10):573-81.
- [65] Fagotto F, Jho Eh, Zeng L, Kurth T, Joos T, Kaufmann C, Costantini F, Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization. *J Cell Biol.* 1999 May 17;145(4):741-56.
- [66] Kishida M, Koyama S, Kishida S, Matsubara K, Nakashima S, Higano K, Takada R, Takada S, Kikuchi A, Axin prevents Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *Oncogene.* 1999 Jan 28;18(4):979-85.
- [67] Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A, 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.* 1998 Mar 2;17(5):1371-84.
- [68] Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R, beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997 Jul 1;16(13):3797-804.
- [69] Jiang J, Struhl G, Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature.* 1998 Jan 29;391(6666):493-6.
- [70] Marikawa Y, Elinson RP, beta-TrCP is a negative regulator of Wnt/beta-catenin signaling pathway and dorsal axis formation in *Xenopus* embryos. *Mech Dev.* 1998 Sep;77(1):75-80.

- [71] Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N, Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev.* 1998 Aug 15;12(16):2610-22.
- [72] Boutros M, Mihaly J, Bouwmeester T, Mlodzik M, Signaling specificity by Frizzled receptors in *Drosophila*. *Science.* 2000 Jun 9;288(5472):1825-8.
- [73] Smalley MJ, Sara E, Paterson H, Naylor S, Cook D, Jayatilake H, Fryer LG, Hutchinson L, Fry MJ, Dale TC, Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J.* 1999 May 17;18(10):2823-35.
- [74] Hao X, Tomlinson I, Ilyas M, Palazzo JP, Talbot IC, Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch.* 1997 Sep;431(3):167-72.
- [75] Munné A, Fabre M, Mariñoso ML, Gallén M, Real FX, Nuclear beta-catenin in colorectal tumors: to freeze or not to freeze? *J Histochem Cytochem.* 1999 Aug;47(8):1089-94.
- [76] Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E, Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell.* 2004 Sep 3;118(5):635-48.
- [77] Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W, beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell.* 2001 May 18;105(4):533-45.
- [78] Merrill BJ, Gat U, DasGupta R, Fuchs E, Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev.* 2001 Jul 1;15(13):1688-705.
- [79] Lowry WE, Blanpain C, Nowak JA, Guasch G, Lewis L, Fuchs E, Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev.* 2005 Jul 1;19(13):1596-611.
- [80] Angerer LM, Angerer RC, Regulative development of the sea urchin embryo: signalling cascades and morphogen gradients. *Semin Cell Dev Biol.* 1999 Jun;10(3):327-34.
- [81] Kim K, Lu Z, Hay ED, Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int.* 2002;26(5):463-76.
- [82] Mariadason JM, Bordonaro M, Aslam F, Shi L, Kuraguchi M, Velcich A, Augenlicht LH, Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res.* 2001 Apr 15;61(8):3465-71.
- [83] Müller T, Bain G, Wang X, Papkoff J, Regulation of epithelial cell migration and tumor formation by beta-catenin signaling. *Exp Cell Res.* 2002 Oct 15;280(1):119-33.
- [84] Naishiro Y, Yamada T, Takaoka AS, Hayashi R, Hasegawa F, Imai K, Hirohashi S, Restoration of epithelial cell polarity in a colorectal cancer cell line by suppression of beta-catenin/T-cell factor 4-mediated gene transactivation. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61(6):2751-8.
- [85] Le NH, Franken P, Fodde R, Tumour-stroma interactions in colorectal cancer: converging on beta-catenin activation and cancer stemness. *Br J Cancer.* 2008 Jun 17;98(12):1886-93. doi: 10.1038/sj.bjc.6604401.
- [86] Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A, Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol.* 2003 Nov 24;163(4):847-57.
- [87] Fodde R, Smits R, Clevers H, APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001 Oct;1(1):55-67.
- [88] Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW, Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science.* 1997 Mar 21;275(5307):1787-90.

- [89] Pinto D, Clevers H, Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res.* 2005 Jun 10;306(2):357-63.
- [90] Hanahan D, Weinberg RA, The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- [91] He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW, Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998 Sep 4;281(5382):1509-12.
- [92] Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A, The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 11;96(10):5522-7.
- [93] Hiendlmeyer E, Regus S, Wassermann S, Hlubek F, Haynl A, Dimmler A, Koch C, Knoll C, van Beest M, Reuning U, Brabletz T, Kirchner T, Jung A, Beta-catenin up-regulates the expression of the urokinase plasminogen activator in human colorectal tumors. *Cancer Res.* 2004 Feb 15;64(4):1209-14.
- [94] Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C, Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 16;96(4):1603-8.
- [95] Hlubek F, Jung A, Kotzor N, Kirchner T, Brabletz T, Expression of the invasion factor laminin gamma2 in colorectal carcinomas is regulated by beta-catenin. *Cancer Res.* 2001 Nov 15;61(22):8089-93.
- [96] Hlubek F, Spaderna S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T, Beta-catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 gamma2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas. *Int J Cancer.* 2004 Jan 10;108(2):321-6.
- [97] Beiter K, Hiendlmeyer E, Brabletz T, Hlubek F, Haynl A, Knoll C, Kirchner T, Jung A, beta-Catenin regulates the expression of tenascin-C in human colorectal tumors. *Oncogene.* 2005 Dec 8;24(55):8200-4.
- [98] Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals ST, Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol.* 1999 Feb;154(2):515-23.
- [99] Hajra KM, Chen DY, Fearon ER, The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res.* 2002 Mar 15;62(6):1613-8.
- [100] Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC, Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet.* 2003 Jul 19;362(9379):205-9.
- [101] Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM, Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res.* 2001 Dec 15;61(24):8664-7.
- [102] Jaitner S, Reiche JA, Schäffauer AJ, Hiendlmeyer E, Herbst H, Brabletz T, Kirchner T, Jung A, Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a target gene of β -catenin in human colorectal tumors. *Cell Cycle.* 2012 Sep 1;11(17):3331-8. doi: 10.4161/cc.21790.
- [103] van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H, The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell.* 2002 Oct 18;111(2):241-50.
- [104] Jung A, Brabletz T, Kirchner T, The migrating cancer stem cells model--a conceptual explanation of malignant tumour progression. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2006;(5):109-24.
- [105] Umar S, Intestinal stem cells. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010 Oct;12(5):340-8. doi: 10.1007/s11894-010-0130-3.
- [106] Barker N, van de Wetering M, Clevers H, The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 2008 Jul

15;22(14):1856-64. doi: 10.1101/gad.1674008.

- [107] Höcker M, Wiedenmann B, Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Nov 17;859:160-74.
- [108] Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D, Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci.* 1994 Dec;107 (Pt 12):3569-77.
- [109] Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW, Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2044-58. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.054.
- [110] Fearon ER, Vogelstein B, A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1;61(5):759-67.
- [111] Sancho E, Batlle E, Clevers H, Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:695-723.
- [112] Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW, APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* 1992 Sep 17;359(6392):235-7.
- [113] Giles RH, van Es JH, Clevers H, Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jun 5;1653(1):1-24.
- [114] Brabletz T, Jung A, Kirchner T, Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2002 Jul;441(1):1-11.
- [115] Yona S, Lin HH, Siu WO, Gordon S, Stacey M, Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors. *Trends Biochem Sci.* 2008 Oct;33(10):491-500. doi: 10.1016/j.tibs.2008.07.005.
- [116] Langenhan T, Aust G, Hamann J, Sticky signaling--adhesion class G protein-coupled receptors take the stage. *Sci Signal.* 2013 May 21;6(276):re3. doi: 0.1126/scisignal.2003825.
- [117] Araç D, Boucard AA, Bolliger MF, Nguyen J, Soltis SM, Südhof TC, Brunger AT, A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoprolysis. *EMBO J.* 2012 Mar 21;31(6):1364-78. doi: 10.1038/emboj.2012.26.
- [118] Gray JX, Haino M, Roth MJ, Maguire JE, Jensen PN, Yarme A, Stetler-Stevenson MA, Siebenlist U, Kelly K, CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J Immunol.* 1996 Dec 15;157(12):5438-47.
- [119] Lin HH, Chang GW, Davies JQ, Stacey M, Harris J, Gordon S, Autocatalytic cleavage of the EMR2 receptor occurs at a conserved G protein-coupled receptor proteolytic site motif. *J Biol Chem.* 2004 Jul 23;279(30):31823-32.
- [120] Leemans JC, te Velde AA, Florquin S, Bennink RJ, de Bruin K, van Lier RA, van der Poll T, Hamann J, The epidermal growth factor-seven transmembrane (EGF-TM7) receptor CD97 is required for neutrophil migration and host defense. *J Immunol.* 2004 Jan 15;172(2):1125-31.
- [121] Hamann J, Vogel B, van Schijndel GM, van Lier RA, The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF). *J Exp Med.* 1996 Sep 1;184(3):1185-9.
- [122] Stacey M, Chang GW, Davies JQ, Kwakkenbos MJ, Sanderson RD, Hamann J, Gordon S, Lin HH. The epidermal growth factor-like domains of the human EMR2 receptor mediate cell attachment through chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Blood.* 2003 Oct 5;102(8):2916-24.
- [123] Wang T, Ward Y, Tian L, Lake R, Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Kelly K, CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counterreceptors on endothelial cells. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2836-44.
- [124] Wandel E, Saalbach A, Sittig D, Gebhardt C, Aust G, Thy-1 (CD90) is an interacting partner for CD97 on activated endothelial cells. *J Immunol.* 2012 Feb 1;188(3):1442-50. doi: 10.4049/jimmunol.1003944.
- [125] Eichler W, Aust G, Hamann D, Characterization of an early activation-dependent antigen on

- lymphocytes defined by the monoclonal antibody BL-Ac(F2). *Scand J Immunol.* 1994 Jan;39(1):111-5.
- [126] Aust G, Eichler W, Laue S, Lehmann I, Heldin NE, Lotz O, Scherbaum WA, Dralle H, Hoang-Vu C, CD97: a dedifferentiation marker in human thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 1997 May 1;57(9):1798-806.
- [127] Ward Y, Lake R, Martin PL, Killian K, Salerno P, Wang T, Meltzer P, Merino M, Cheng SY, Santoro M, Garcia-Rostan G, Kelly K, CD97 amplifies LPA receptor signaling and promotes thyroid cancer progression in a mouse model. *Oncogene.* 2013 May 30;32(22):2726-38. doi: 10.1038/onc.2012.301.
- [128] Wu J, Lei L, Wang S, Gu D, Zhang J, Immunohistochemical expression and prognostic value of CD97 and its ligand CD55 in primary gallbladder carcinoma. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:587672. doi: 10.1155/2012/587672.
- [129] Safaee M, Clark AJ, Oh MC, Ivan ME, Bloch O, Kaur G, Sun MZ, Kim JM, Oh T, Berger MS, Parsa AT, Overexpression of CD97 confers an invasive phenotype in glioblastoma cells and is associated with decreased survival of glioblastoma patients. *PLoS One.* 2013 Apr 26;8(4):e62765. doi: 10.1371/journal.pone.0062765. Print 2013.
- [130] Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, Stow P, Su X, Shurtleff S, Pui CH, Downing JR, Campana D, New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2011 Jun 9;117(23):6267-76. doi: 10.1182/blood-2010-12-324004.
- [131] Mirkowska P, Hofmann A, Sedek L, Slamova L, Mejstrikova E, Szczepanski T, Schmitz M, Cario G, Stanulla M, Schrappe M, van der Velden VH, Bornhauser BC, Wollscheid B, Bourquin JP, Leukemia surfaceome analysis reveals new disease-associated features. *Blood.* 2013 Jun 20;121(25):e149-59. doi: 10.1182/blood-2012-11-468702.
- [132] Bonardi F, Fusetti F, Deelen P, van Gosliga D, Vellenga E, Schuringa JJ, A proteomics and transcriptomics approach to identify leukemic stem cell (LSC) markers. *Mol Cell Proteomics.* 2013 Mar;12(3):626-37. doi: 10.1074/mcp.M112.021931.
- [133] Jaspars LH, Vos W, Aust G, Van Lier RA, Hamann J, Tissue distribution of the human CD97 EGF-TM7 receptor. *Tissue Antigens.* 2001 Apr;57(4):325-31.
- [134] Visser L, de Vos AF, Hamann J, Melief MJ, van Meurs M, van Lier RA, Laman JD, Hintzen RQ, Expression of the EGF-TM7 receptor CD97 and its ligand CD55 (DAF) in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2002 Nov;132(1-2):156-63.
- [135] Eichler W, Hamann J, Aust G, Expression characteristics of the human CD97 antigen. *Tissue Antigens.* 1997 Nov;50(5):429-38.
- [136] Boltze C, Schneider-Stock R, Aust G, Mawrin C, Dralle H, Roessner A, Hoang-Vu C, CD97, CD95 and Fas-L clearly discriminate between chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma in perioperative evaluation of cryocut sections. *Pathol Int.* 2002 Feb;52(2):83-8.
- [137] Aust G, Wandel E, Boltze C, Sittig D, Schütz A, Horn LC, Wobus M, Diversity of CD97 in smooth muscle cells. *Cell Tissue Res.* 2006 Apr;324(1):139-47.
- [138] Veninga H, Becker S, Hoek RM, Wobus M, Wandel E, van der Kaa J, van der Valk M, de Vos AF, Haase H, Owens B, van der Poll T, van Lier RA, Verbeek JS, Aust G, Hamann J, Analysis of CD97 expression and manipulation: antibody treatment but not gene targeting curtails granulocyte migration. *J Immunol.* 2008 Nov 1;181(9):6574-83.
- [139] Becker S, Wandel E, Wobus M, Schneider R, Amasheh S, Sittig D, Kerner C, Naumann R, Hamann J, Aust G, Overexpression of CD97 in intestinal epithelial cells of transgenic mice attenuates colitis by strengthening adherens junctions. *PLoS One.* 2010 Jan 13;5(1):e8507. doi: 10.1371/journal.pone.0008507.
- [140] Aust G, Steinert M, Schütz A, Boltze C, Wahlbuhl M, Hamann J, Wobus M, CD97, but not its closely related EGF-TM7 family member EMR2, is expressed on gastric, pancreatic, and esophageal carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2002 Nov;118(5):699-707.

- [141] Steinert M, Wobus M, Boltze C, Schütz A, Wahlbuhl M, Hamann J, Aust G, Expression and regulation of CD97 in colorectal carcinoma cell lines and tumor tissues. *Am J Pathol.* 2002 Nov;161(5):1657-67.
- [142] Mustafa T, Eckert A, Klonisch T, Kehlen A, Maurer P, Klintschar M, Erhuma M, Zschoyan R, Gimm O, Dralle H, Schubert J, Hoang-Vu C, Expression of the epidermal growth factor seven-transmembrane member CD97 correlates with grading and staging in human oral squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Jan;14(1):108-19.
- [143] Ward Y, Lake R, Yin JJ, Heger CD, Raffeld M, Goldsmith PK, Merino M, Kelly K, LPA receptor heterodimerizes with CD97 to amplify LPA-initiated RHO-dependent signaling and invasion in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2011 Dec 1;71(23):7301-11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2381.
- [144] Chidambaram A, Fillmore HL, Van Meter TE, Dumur CI, Broaddus WC, Novel report of expression and function of CD97 in malignant gliomas: correlation with Wilms tumor 1 expression and glioma cell invasiveness. *J Neurosurg.* 2012 Apr;116(4):843-53. doi: 10.3171/2011.11.JNS111455.
- [145] Brabletz T, Jung A, Hermann K, Günther K, Hohenberger W, Kirchner T, Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract.* 1998;194(10):701-4.
- [146] Wobus M, Huber O, Hamann J, Aust G, CD97 overexpression in tumor cells at the invasion front in colorectal cancer (CC) is independently regulated of the canonical Wnt pathway. *Mol Carcinog.* 2006 Nov;45(11):881-6.
- [147] Hendriksen J, Jansen M, Brown CM, van der Velde H, van Ham M, Galjart N, Offerhaus GJ, Fagotto F, Fornerod M. Plasma membrane recruitment of dephosphorylated beta-catenin upon activation of the Wnt pathway. *J Cell Sci.* 2008 Jun 1;121(11):1793-802. doi: 10.1242/jcs.025536.
- [148] Hsiao CC, Keysselt K, Chen HY, Sittig D, Hamann J, Lin HH, Aust G. The Adhesion GPCR CD97/ADGRE5 inhibits apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Aug;65:197-208. doi: 10.1016/j.biocel.2015.06.007.
- [149] Galle J, Sittig D, Hanisch I, Wobus M, Wandel E, Loeffler M, Aust G. Individual cell-based models of tumor-environment interactions: Multiple effects of CD97 on tumor invasion. *Am J Pathol.* 2006 Nov;169(5):1802-11.
- [150] Jung A, Schrauder M, Oswald U, Knoll C, Sellberg P, Palmqvist R, Niedobitek G, Brabletz T, Kirchner T The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows colocalization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am. J. Pathol.* 159 (2001) 1613-1617.
- [151] Dawson H, Koelzer VH, Karamitopoulou E, Economou M, Hammer C, Muller DE, Lugli A, Zlobec I The apoptotic and proliferation rate of tumour budding cells in colorectal cancer outlines a heterogeneous population of cells with various impacts on clinical outcome. *Histopathology* 64 (2014) 577-584.
- [152] Aust G, Kerner C, Gonsior S, Sittig D, Schneider H, Buske P, Scholz M, Dietrich N, Oldenburg S, Karpus ON, Galle J, Amasheh S, Hamann J. Mice overexpressing CD97 in intestinal epithelial cells provide a unique model for mammalian postnatal intestinal cylindrical growth. *Mol Biol Cell.* 2013 Jul;24(14):2256-68. doi: 10.1091/mbc.E13-04-0175.

9. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....
Datum

.....
Unterschrift

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dietrich, Norman
Anschrift: Kantstraße 49
04275 Leipzig
Tel: 0176 / 666 555 03
E-Mail: norman.dietrich@web.de
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 26. Juli 1985
Geburtsort: Leipzig
Familienstand: ledig

Berufliche Laufbahn

Seit März 2012 Assistenzarzt, Sana Klinikum Borna, Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin, Schmerztherapie und Palliativmedizin

Hochschulstudium

Seit Juli 2008 Promotion „Der Adhäsions-GPCR CD97 interagiert in *adherence junctions* mit β -catenin“ in der Klinik für Visceral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Leipzig
Oktober 2007 – Mai 2012 Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Universität Leipzig, mit erfolgreichem Abschluss des 2. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen)
Oktober 2005 – September 2007 Vorklinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Universität Leipzig, mit erfolgreichem Abschluss des 1. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung (Physikum)

Schulische Ausbildung

August 1996 – Juli 2004 Martin – Rinckart – Gymnasium Eilenburg, Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
August 1992 – Juni 1996 Grundschule Berg Eilenburg

Praktischen Erfahrungen

Oktober 2011 – Januar 2011 Praktisches Jahr, 3.Tertial: Innere Medizin (Nephrologie und Geriatrie) Klinikum St. Georg gGmbH Leipzig
Juni 2011 – September 2011 Praktisches Jahr, 2.Tertial: Chirurgie St. Elisabeth Krankenhaus Leipzig
Februar 2011 – Juni 2011 Praktisches Jahr, 1.Tertial: Anästhesiologie Klinikum St. Georg gGmbH Leipzig

März 2010	Famulatur, 4 Wochen: Radiologie Kantonsspital Graubünden (Schweiz)
März 2009	Famulatur, 2 Wochen: Rheumatologie Universitätsklinikum Leipzig
Juli 2008 – September 2008	Famulatur, 6 Wochen: Herzzentrum Leipzig
Februar 2008 – März 2008	Famulatur, 4 Wochen: Orthopädische Klinik und Poliklinik Leipzig
April 2007 – Juli 2007	Tutor im Präparierkurs des Anatomie-Instituts der Universität Leipzig
Juli 2006 – August 2006	Krankenpflegedienst, 4 Wochen: Gastroenterologische Station im Universitätskinderklinikum Leipzig
Juli 2004 – April 2005	Zivildienst im „Städtischen Altenpflegeheim am Rosental“ in Leipzig

11. Publikationen

Aust G, Kerner C, Gonsior S, Sittig D, Schneider H, Buske P, Scholz M, Dietrich N, Oldenburg S, Karpus ON, Galle J, Amasheh S, Hamann J. Mice overexpressing CD97 in intestinal epithelial cells provide a unique model for mammalian postnatal intestinal cylindrical growth. *Mol Biol Cell*. 2013 Jul;24(14):2256-68. doi: 10.1091/mbc.E13-04-0175.

12. Danksagung

Diese Arbeit ist in den Forschungslaboren der Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Leipzig entstanden. Deshalb gilt mein besonderer Dank an dieser Stelle meiner Doktormutter Frau Prof. rer. nat. Gabriela Aust.

Frau Prof. rer. nat. Aust gab mir die Möglichkeit, dieses spannende Projekt durchzuführen und unterstützte mich fachlich und moralisch zu jedem Zeitpunkt. Auch in stressigen Zeiten hatte sie immer ein offenes Ohr sowie gute Einfälle bei Fragen und Problemen. Sie half mir stets, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Dr. med. Susann Gonsior bedanken, die mich v.a. bei den histologischen Untersuchungen sehr unterstützte und jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich danke dem Team der Forschungslabore der Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Leipzig, v.a. Frau Dr. Elke Wandel, Doris Hilbig, Kerstin Keyßelt, Doreen Sittig, Christiane Kerner und Claudia Vogel. Ich habe mich stets gut in das Team eingebunden gefühlt und konnte jederzeit auf Hilfe und Unterstützung bauen.

Für die uneingeschränkte und vielseitige Unterstützung nicht nur während der Anfertigung der Dissertation danke ich meiner Familie und meinen Freunden.