

Institut für Pathologie
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Baretton

Die Rolle des N-Cadherin im Mammakarzinom

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Anna Sophia Kienel

aus Stuttgart

Dresden 2015

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Tag der mündlichen Prüfung:

gez.: _____

Vorsitzender der Promotionskommission

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Tumorentstehung und -progression.....	1
1.2 Der Prozess der Metastasierung	4
1.2.1 Epithelial-mesenchymale Transition	4
1.3 Brustkrebs.....	7
1.3.1 Histologie und Klassifizierung.....	7
1.4 Cadherine	11
1.4.1 Klassische Cadherine.....	11
1.4.2 VE-Cadherin	13
1.4.3 N-Cadherin.....	14
2 Fragestellung	16
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Material	18
3.1.1 Geräte.....	18
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
3.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Kits	22
3.1.4 Puffer, Ansätze und Gele	25
3.1.5 Antikörper.....	28
3.1.6 Primer	29
3.1.7 Zellkultur	30
3.1.8 Software.....	32
3.2 Methoden	33
3.2.1 Kultivierung der Zellen.....	33
3.2.2 Proteinisolierung und Western Blot	34
3.2.3 RNA-Isolierung und Polymerasekettenreaktion	36
3.2.4 Immunfluoreszenz.....	40
3.2.5 Untersuchung des Proliferationsverhaltens	41
3.2.6 Sphäroidversuch	43
3.2.7 Untersuchung des Migrationsverhaltens mittels Boyden-Chamber.....	44
3.2.8 Untersuchung des Migrationsverhaltens mittels <i>in vitro</i> Wundheilungsversuch.....	45
3.2.9 Untersuchung des Invasionsverhaltens.....	46
3.2.10 Statistische Analyse	49

4	Ergebnisse	50
4.1	Charakterisierung der N-Cadherin defizienten Klone	50
4.1.1	Untersuchung der E-, N- und VE-Cadherin-Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und q-PCR	53
4.1.2	Untersuchung der E-, N- und VE-Cadherin-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot	56
4.1.3	Untersuchung der E-, N- und VE-Cadherin-Expression und -Lokalisation mittels Immunfluoreszenzfärbung	57
4.2	Einfluss des N-Cadherin auf das Proliferationsverhalten	61
4.3	Einfluss des N-Cadherin auf die Sphäroidbildung	62
4.4	Einfluss des N-Cadherin auf das Migrationsverhalten	64
4.5	Einfluss des N-Cadherin auf das Invasionsverhalten	69
5	Diskussion	71
5.1	N-Cadherin-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Expression und subzelluläre Lokalisation von E-Cadherin in der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT	72
5.2	N-Cadherin-Defizienz führt zu deutlicher Herabregulierung der VE-Cadherin- Expression in der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT	73
5.3	N-Cadherin-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Proliferation der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT	74
5.4	N-Cadherin-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Sphäroidbildung der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT	74
5.5	N-Cadherin-Defizienz führt zu signifikant verringerter Migration der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT	75
5.6	N-Cadherin-Defizienz führt zu signifikant verringerter Invasion der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT	76
6	Zusammenfassung	79
7	Abbildungsverzeichnis	83
8	Tabellenverzeichnis	84
9	Literaturverzeichnis	85
10	Danksagung	104

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Definition
A	Ampere
A. dest.	Aqua destillata
ADH-1	N-Acetyl-CysHisAlaValCys-NH ₂ N-Cadherin-Antagonist
AKT-3	Gen für die RAC-gamma Serin/Threonin-Proteinkinase
Ala	Alanin Aminosäure
bp	Basenpaare
BRCA1/2	Breast cancer gene 1 and 2 Gene deren Mutation einen Risikofaktor darstellen, jung an Brustkrebs zu erkranken
BSA	Bovine serum albumin Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CDK	Cyclin-dependent kinase Cyclin-abhängige Kinase
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cDNA	Komplementäre DNA
Cys	Cystein Aminosäure
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dNTPs	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
EC1-EC5	Extrazelluläre sich wiederholende Cadherin-Domänen
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Estrogenrezeptor
ERK	Extracellular-signal regulated Kinase
et al.	Et alii/et aliae
FGF	Fibroblast growth factor Fibroblastenwachstumsfaktor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gravity Erdbeschleunigung, wobei $g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
H	Wasserstoff
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HAV-Motiv	Histidin-Alanin-Valin-Motiv
HER-2	Human epidermal growth factor receptor-2 Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-2
HER-3	Human epidermal growth factor receptor-3 Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-3
His	Histidin Aminosäure
HPLC	High-performance liquid chromatography Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish peroxidase Merrettichperoxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
kD	Kilodalton

M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MMP	Metalloproteinase
mRNA	Messenger ribonucleic acid Boten-Ribonukleinsäure
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Cadherin	Neuronales Cadherin
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPIA	Peptidylprolylisoimerase A
PR	Progesteronrezeptor
q-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
Rb-Protein	Retinoblastomprotein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunden
Scr2_2	“SUM149 N/Scramble2_2” Kontrollklon der Zelllinie SUM149PT
Scr2_6	“SUM149 N/Scramble2_6” Kontrollklon der Zelllinie SUM149PT
SCR	Surface coverage rate Flächenbedeckungsrate

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	short hairpin RNA kurze Haarnadel-RNA
Sh-N-cad-3	“SUM149PT N/SH14I-3” N-Cadherin-Knock-down-Klon der Zelllinie Sum149PT
Sh-N-cad-12	“SUM149PT N/SH14I-12” N-Cadherin-Knock-down-Klon der Zelllinie Sum149PT
SUM149PT	Epitheliale humane Brustkrebszelllinie
T47D	Epitheliale humane Brustkrebszelllinie
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBP	TATA-Bindungsprotein
TEM	Transendotheliale Migration
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TGF- β	Transforming growth factor- β Transformierender Wachstumsfaktor- β
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin Aminosäure
VE-Cadherin	Vasculär-endotheliales Cadherin
VEGF	Vascular endothelial growth factor Vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor Vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor
WHO	World health organization Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

Tumorerkrankungen gehören mittlerweile weltweit zu den zehn häufigsten Todesursachen. In den Industrieländern standen sie 2012 laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) auf Platz drei. In Deutschland waren 2013 nach Angaben des statistischen Bundesamtes direkt nach den Herz-Kreislaufkrankungen die meisten Sterbefälle auf Krebsleiden zurückzuführen. Die Pathogenese, Diagnostik und Therapie onkologischer Erkrankungen, sowie der Umgang mit krebserkrankten PatientInnen gewinnt daher weltweit und in der Medizin fächerübergreifend immer mehr an Bedeutung.

1.1 Tumorentstehung und -progression

Ein Tumor ist eine Zunahme an Gewebemasse, die durch unvollständig reguliertes Zellwachstum zustande kommt. Säugetierzellen besitzen verschiedene Mechanismen, um ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Zellproliferation und Zelltod zu gewährleisten, und komplizierte Kontrollen, um sich vor potenziell schädlichen Mutationen in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu schützen (Vogelstein & Kinzler, 2004; Hanahan & Weinberg, 2000).

Trotzdem kommt es immer wieder zu Änderungen in der DNA, sei es spontan, durch Replikationsfehler oder durch biologische, chemische oder physikalische, exogene Einflüsse wie Viren, Chemikalien oder Strahlung. Selten löst dabei eine einzige Mutation die Entstehung von Tumoren aus. Eine Ansammlung von Mutationen in Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen oder „Stabilitätsgenen“ (stability genes) kann aber zur Kanzerogenese führen (Vogelstein & Kinzler, 2004). Onkogene und Tumorsuppressorgene greifen an der Regulierung von Zellwachstum und -tod an. In Tumorzellen führt zum Beispiel eine Mutation in oder eine vermehrte Expression der Genprodukte von Onkogenen, aber auch ein Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen zu übermäßigem Wachstum (Lee & Muller, 2010). „Stabilitätsgene“ sind dafür zuständig, DNA-Veränderungen auf einem Minimum zu halten. Bei Inaktivierung eines solchen Gens finden demzufolge vermehrt Mutationen in anderen Genen statt (Friedberg, 2003). Während der Kanzerogenese erlangen die Tumorzellen bestimmte Eigenschaften, die sie von normalen Zellen unterscheiden. Hanahan und Weinberg beschreiben diese Eigenschaften als die sechs Kennzeichen des Krebses (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011):

1) Verstärkung proliferativer Signale

Im Gegensatz zu normalen Zellen können Tumorzellen einer strengen Regulierung durch Ausschüttung von und das Ansprechen auf Wachstumsfaktoren entgehen. So sind Tumorzellen beispielsweise in der Lage, vermehrt Wachstumsfaktorrezeptoren zu produzieren, sich durch selbst gebildete Wachstumsfaktorliganden autokrin zu stimulieren oder andere Zellen dazu anzuregen, Wachstumsfaktoren auszuschütten (Cheng et al., 2008). Bekannte Beispiele für in Tumorzellen überexprimierte oder mutierte Proteine sind c-myc, das die Expression von Genen beeinflusst, die GTPase ras oder die Kinase mTOR (Hanahan & Weinberg, 2011; Iurlaro et al., 2014).

2) Umgehung wachstumshemmender Signale

Tumorzellen müssen auch die Fähigkeit besitzen, wachstumshemmenden Regulationsmechanismen entgehen zu können. Hier spielen vor allem Mutationen in Tumorsuppressorgenen eine Rolle. Ein Protein, das von einem Tumorsuppressorgen kodiert wird, ist beispielsweise p53, welches sowohl proliferationshemmend in den Zellzyklus eingreifen, die DNA-Reparatur regulieren, als auch die Apoptose triggern kann (Hanahan & Weinberg, 2011). Die Mehrzahl sporadisch auftretender Karzinome weist einen Aktivitäts- oder Funktionsverlust von p53 auf (Song & Xu, 2007; Merino & Malkin, 2014). Tumorzellen sind auch in der Lage der Inhibition des Wachstums und Induktion der Differenzierung durch Kontakt mit den Nachbarzellen zu umgehen (Hanahan & Weinberg, 2011).

3) Schutz vor Apoptose

Liegen in einer Zelle irreversible Schädigungen vor, oder wird sie nicht mehr benötigt, wird unter normalen Umständen der Mechanismus zum programmierten Zelltod, der Apoptose, ausgelöst (Hug, 2000). Tumorzellen können auf verschiedenen Wegen dem Prozess der Apoptose entgehen und so ihr Überleben sichern.

4) Erlangung reproduktiver Unsterblichkeit

Die unter normalen Umständen das Alter einer Zelle begrenzende Möglichkeit zur Zellteilung ist abhängig von der Länge der Chromosomentelomere, die bei jeder Replikation gekürzt werden (Hayflick, 1997; Shay & Wright, 2000; Blasco, 2005). Die Telomerase, ein Enzym, das sich wiederholende Telomerasequenzen an DNA-Telomere anhängen kann, kommt in normalen Zellen so gut wie nicht vor, wird aber in etwa 90% aller spontan immortalisierten Zellen, und so auch in Tumorzellen, exprimiert, so dass der natürliche Alterungsprozess gestoppt wird (Hanahan & Weinberg, 2011).

5) Auslösen der Angiogenese

Erfolgt eine Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen nur durch Diffusion, kann ein Tumor nicht größer als einige Kubikmillimeter werden (Gastl et al, 1997). Das Wachstum und die Metastasierung solider Tumore sind daher stark von der Gefäßversorgung abhängig. Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, das Aussprossen neuer Gefäße zu regulieren. Ein bekannter Mechanismus ist zum Beispiel die Hochregulation des VEGF (vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor) (Breier & Risau, 1996; Hanahan & Folkmann, 1996).

6) Aktivierung von Invasion und Metastasierung

Im Laufe der Tumorprogression können einzelne Tumorzellen Fähigkeiten erlangen, die es ihnen ermöglichen, den Primärtumor zu verlassen, in andere Gewebe und Organe zu gelangen und dort Metastasen zu bilden. Die Metastasierung ist ein komplizierter mehrstufiger Prozess, zu der unter anderem ein Erwerb einer erhöhten Zellmotilität und eines gesteigerten Invasionspotenzials gehören (Jechlinger et al., 2003; Hanahan & Weinberg, 2011) (siehe auch 1.2).

Neben diesen sechs klassischen beschreiben Hanahan und Weinberg noch zwei weitere mögliche Kennzeichen von Tumoren (Hanahan & Weinberg, 2011): die Umprogrammierung des Energiestoffwechsels, um das gesteigerte Zellwachstum zu ermöglichen, sowie die Fähigkeit, der körpereigenen Immunabwehr zu entgehen. Immer mehr Bedeutung wird auch der Kommunikation zwischen den Tumorzellen und den sie umgebenden Zellen, der sogenannten Micro-Umgebung, beigemessen. So wird beispielsweise die Lymphangiogenese von tumorzellassoziierten Fibroblasten und Makrophagen beeinflusst (Hanahan & Weinberg, 2011; Chen et al., 2014). Auch ein Nichtansprechen auf Chemotherapien könnte durch Zellen der Mikro-Umgebung ausgelöst werden (Sun, 2015).

1.2 Der Prozess der Metastasierung

In 90% aller Sterbefälle durch onkologische Erkrankungen ist die Todesursache nicht der Primärtumor, sondern die von ihm ausgegangenen Metastasen (Koo et al, 2002; Cavallaro & Christofori, 2004a; Reymond et al., 2013; Jacob & Prekeris, 2015), sodass der Prozess der Metastasierung von großer Bedeutung ist.

Etwa 70–80% aller menschlichen Tumore gehen aus Epithelzellen hervor (Cavallaro & Christofori, 2004b; van Roy, 2014). Epithelzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie polar auf der Basalmembran angeordnet sind. Kommt es zu einer malignen Entartung, werden die Zellen dysplastisch und beginnen sich vermehrt zu teilen. Es entsteht ein aus Epithelzellen gebildeter Tumor, der die Basalmembran noch nicht durchbrochen hat; ein sogenanntes Carcinoma *in situ*. Eine weitere Expansion des Tumors kann nur stattfinden, wenn die Basalmembran durchbrochen wird (Hanahan & Weinberg, 2011). Die Invasion durch die Basalmembran und das umgebende Gewebe ist der erste Schritt zur Metastasierung und wird durch die Sekretion bestimmter Proteine, beispielsweise der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 ermöglicht (Egeblad & Werb, 2002; Geho et al., 2005; Jacob & Prekeris, 2015). Der nächste Schritt zur Streuung der Tumorzellen ist deren Intravasation, also das Einwandern in umgebende Lymph- oder Blutgefäße, in denen sie durch den Körper zirkulieren können (Wyckoff et al., 2000; Alitalo et al., 2005). Die Anlagerung der Tumorzellen an die Endothelzellen der Gefäßwand ist die Voraussetzung der Extravasation (Stoletov et al., 2010). Der Vorgang des Durchwanderns des Endothels bei Intra- und Extravasation wird auch als transendotheliale Migration (TEM) bezeichnet, wozu die Expression verschiedener Rezeptoren vonnöten ist (Zen et al., 2008; Reymond et al., 2013). Hier scheint auch der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor HER-2 eine Rolle zu spielen. Momeny und Kollegen fanden kürzlich heraus, dass der HER-2/HER-3-Ligand Heregulin bei Brustkrebszellen *in vitro* die TEM matrixmetalloproteinaseabhängig induziert (Momeny et al., 2014). Ist den Tumorzellen die Extravasation gelungen, müssen sie mit ihrer neuen Mikro-Umgebung interagieren, um proliferieren und Mikrometastasen bilden zu können. Weniger als 0,05% der zirkulierenden Tumorzellen sind auch in der Lage stabile Metastasen auszubilden (Liotta et al., 1974; Reymond et al., 2013).

1.2.1 Epithelial-mesenchymale Transition

Die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und deren Umkehrung, die Mesenchymal-epitheliale Transition (MET), sind von großer Bedeutung in der Embryogenese, sowie bei physiologischen Prozessen wie der Wundheilung (Mjaatvedt & Markwald, 1989; Hay, 1995, Iwatsuki et al., 2010). EMT spielt aber auch in pathologischen Prozessen wie der Tumorentstehung, -invasion und -metastasierung eine Rolle (Thompson et al., 1994; Thiery,

2003; Huber et al., 2005; Lindsey & Langhans, 2014). Die EMT ist ein Veränderungsprozess an Epithelzellen, der zu einer verminderten Adhäsionsfähigkeit, einem Verlust der Zellpolarität, einer gesteigerten Proliferation, Zellmotilität und Invasionsfähigkeit führt (Acloque et al., 2009). Diese Eigenschaften benötigen Tumorzellen, um sich vom Primärtumor lösen zu können, die Basalmembran invasiv zu durchbrechen, durch die extrazelluläre Matrix und umliegendes Gewebe zu migrieren, in Lymph- oder Blutgefäße einzuwandern, im Kreislauf zu zirkulieren und an anderer Stelle das Gefäßsystem wieder zu verlassen. Die EMT stellt damit einen Schlüsselvorgang in der Umwandlung von benignen zu malignen Tumoren dar (Puisieux et al., 2014). Die prognoseverschlechternde Expression von EMT-Markern während der Kanzerogenese korreliert normalerweise mit Tumormigration und -metastasierung (Rafael et al., 2015).

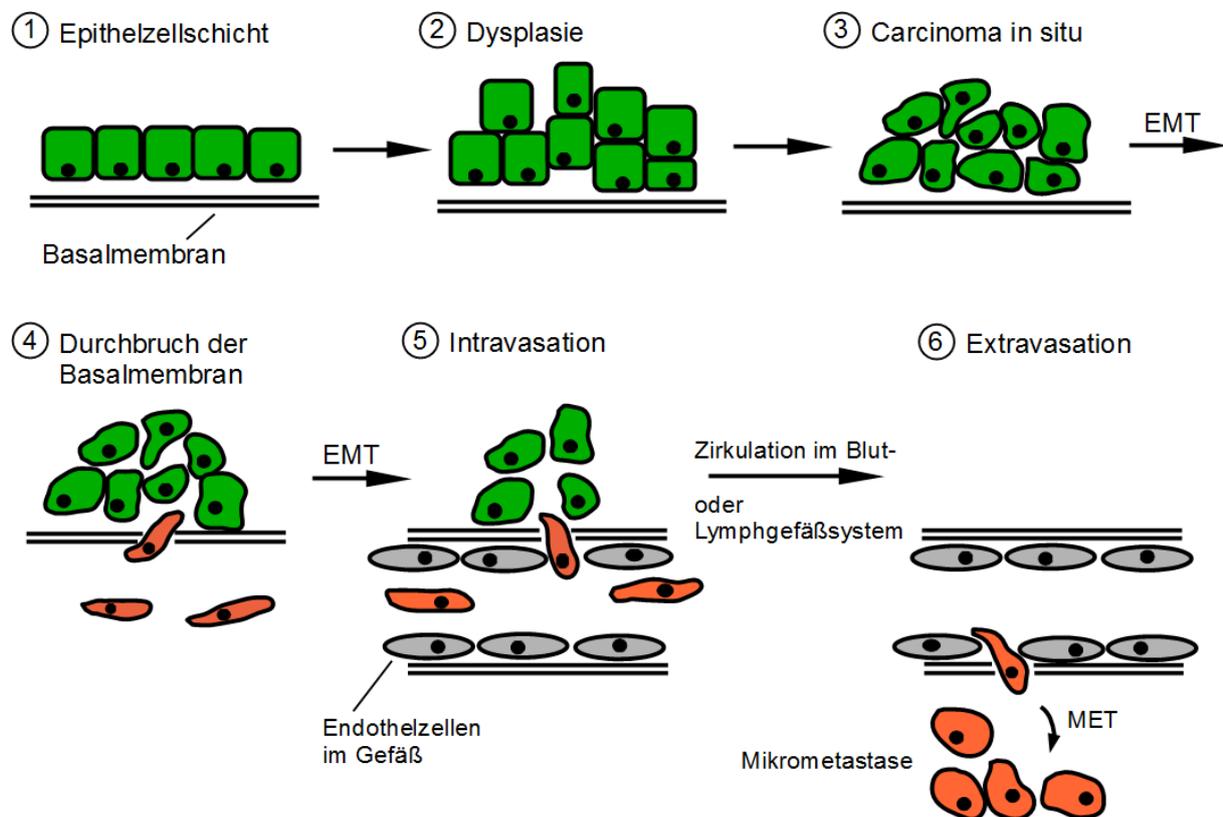


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Auftretens von EMT und MET in Tumorprogression und -metastasierung.

In Bild 1 sitzen die Epithelzellen polar und gleichmäßig angeordnet auf der Basalmembran. Kommt es zu einer malignen Entartung, werden die Zellen dysplastisch (Bild 2), beginnen sich vermehrt zu teilen und es entsteht ein aus Epithelzellen gebildeter Tumor, der die Basalmembran noch nicht durchbrochen hat; ein sogenanntes Carcinoma *in situ* (Bild 3). Um die Basalmembran durchbrechen zu können (Bild 4) und in Blut- oder Lymphgefäße einwandern zu können (Bild 5), benötigen die Zellen migratorische und invasive Eigenschaften, die sie während des Prozesses der EMT erlangen. Nach der Extravasation der zirkulierten Tumorzellen (Bild 6), kann es bei der Bildung von Mikrometastasen zur MET kommen. Abkürzungen: EMT: epithelial-mesenchymale Transition, MET: mesenchymal-epitheliale Transition. Abbildung frei nach Thiery, 2002.

Während des Prozesses der EMT finden verschiedene morphologische und molekulare Veränderungen an den Zellen statt. Die polaren und auf der Basalmembran verankerten kuboiden Epithelzellen verlieren ihre Zell-Zell-Verbindungen und nehmen einen spindelförmigen mesenchymzellartigen Phänotyp an (Yilmaz & Christofori, 2009; Friedl & Wolf, 2010; Micalizzi et al., 2010). Auf molekularer Ebene findet eine Herabregulierung epithelialer Zellmembranmarker wie E-Cadherin und Zonula occludens(ZO)-1 und Komponenten des Zytoskeletts wie Zytokeratin, sowie eine Hochregulation mesenchymaler Marker wie Vimentin und Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin statt (Lee et al., 2006; Zeisberg & Neilson, 2009). Das cadherinassoziierte Protein β -Catenin kann während der EMT von der Zellmembran dislozieren und zum Zellkern wandern, wo es die Genexpression beeinflusst (Gilles et al., 2003; Klymkowsky, 2005; Yilmaz & Christofori, 2009). Die Dislokation des β -Catenins kann unter anderem vom Transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) ausgelöst werden, das bei der Induktion der EMT eine große Rolle spielt (Lindsay & Langhans, 2014). Von Bedeutung sind auch die Transkriptionsrepressoren Snail, Slug und Twist, deren Aktivierung zur Herabregulierung von E-Cadherin führt (Peinado et al., 2007). Es zeichnen sich jedoch noch andere Moleküle ab, die teilweise untereinander vernetzte Signalkaskaden auslösen, die zur EMT führen: Tyrosinkinaserzeptoren einschließlich verschiedener Wachstumsfaktorrezeptoren; Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B); Integrine; und Wnt (Vonach et al., 2011; Chen et al., 2013; Lindsay & Langhans, 2014).

1.3 Brustkrebs

Weltweit nimmt die Inzidenz für Brustkrebs zu; in Ländern mit geringem Bruttoinlandsprodukt pro Kopf steigen auch die Sterbefälle stetig an (Holst et al., 2007; Yip et al., 2008; Porter, 2009). Mit etwa 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr ist Brustkrebs in Deutschland mit Abstand die häufigste onkologische Erkrankung bei Frauen; das bedeutet statistisch betrachtet, dass jede achte deutsche Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt. Meist wird die Primärdiagnose postmenopausal zwischen der 6. und 7. Lebensdekade gestellt. Im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen tritt Brustkrebs jedoch früh auf. 25% der Frauen sind bei Diagnosestellung unter 55, 10% sind unter 45 Jahre alt (nach Angaben des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts für 2013), wobei ein Auftreten der Erkrankung bei jungen Patientinnen häufig mit einer erhöhten Aggressivität des Tumors assoziiert ist (Lee & Han, 2014).

Ein Großteil der Mammakarzinomzellen zeigt eine Mutation in den Genen für p53, Retinoblastomprotein (Rb) (siehe 1.1) oder Phosphatidylinositol-3-kinase (Hollestelle et al., 2010). 25–40% der Brustkrebsdiagnosen bei unter 35-Jährigen sind vererbbarer genetischen Ursprungs (Lux et al., 2006). Hier liegt meist eine Mutation in einem der Regulatorgene Breast Cancer Gene 1 (BRCA1) oder Breast Cancer Gene 2 (BRCA2) zugrunde, die Aufgaben in der DNA-Reparatur und Chromosomenstabilität haben (Sotiriou & Puztai, 2009; Smith & Isaacs, 2011). Eine Mutation in diesen Genen kann daher zu einer genomischen Instabilität und einem erhöhten Krebsrisiko führen (Deng, 2006).

1.3.1 Histologie und Klassifizierung

Fast alle Mammakarzinome sind histologisch betrachtet Adenokarzinome, die sich aus den Epithelzellen der Lumina der Lobuli und Lobuli oder der kleinen und großen Milchgänge ableiten. Die Drüsen und deren Ausführungsgänge sind umgeben von Myoepithelzellen und werden zum umgebenden Gewebe durch die Basalmembran abgegrenzt, deren Durchbruch für die Differenzierung zwischen Carcinoma *in situ* und invasivem Karzinom ausschlaggebend ist (Pinder & Ellis, 2003; Tomaskovic-Crook et al., 2009). Mit 75–80% aller Fälle ist das invasiv duktales Karzinom der am häufigsten beobachtete Mammakarzinomtyp; gefolgt vom invasiv lobulären mit 10% (Li et al., 2005). Das invasiv duktales Karzinom wird von der WHO seit 2012 auch als invasives Mammakarzinom, no special type bezeichnet. Weiter werden histologisch medulläre, muzinöse, metaplastische, neuroendokrine, inflammatorische, tubuläre, apokrine, adenozytische und mikropapilläre Typen unterschieden (Li et al., 2005; Weigelt et al., 2010).

Neben dieser klassischen Klassifizierung findet vor allem die immunpathologische Einteilung Anwendung. Dabei werden die Tumore auf ihre Expression von Östrogenrezeptoren (ER), Progesteronrezeptoren (PR) und des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors-2 (HER2) untersucht (Hollestelle et al., 2010). Das ist vor allem therapeutisch von Bedeutung.

Bei ER+-Tumoren erfolgt eine endokrine Antiöstrogenbehandlung mit ER-Antagonisten oder Aromatasehemmern (Jordan & Brodie, 2007; Patel et al., 2007). Der PR-Status hat eine etwas geringere Bedeutung als der ER-Status; das Ansprechen auf eine endokrine Therapie ist jedoch etwas höher und das relative Sterberisiko sinkt leicht bei ER+/PR+-PatientInnen im Vergleich zu ER+/PR- -Fällen (Bardou et al., 2003; Stendahl et al., 2006; Stotter & Walker, 2010).

Die ER+ und/oder PR+-Tumore werden nach den St. Gallen Leitlinien auch als Subtypen Luminal A und Luminal B bezeichnet, wobei Luminal A einen prozentualen Fallanteil von 40%, Luminal B von 10% hat (Perou & Berresen-Dale, 2011). Luminal A zeichnet sich dadurch aus, dass HER2 zwingend negativ ist, während bei Luminal B HER2- oder HER2+ vorliegen kann. Zusätzlich kann über den Wachstumsmarker Ki67 die Proliferationsrate bestimmt werden, die bei Luminal A niedrig ist, bei Luminal B mit HER2- hoch.

Eine starke Expression von Ki67 scheint mit einer starken Expression des Proteins pS6, einem Marker der mTOR-Aktivität zu korrelieren. Ein Einsatz von mTOR-Inhibitoren wie Everolimus/Rapamycin könnte daher eine zusätzliche Therapiemöglichkeit von ER+/HER2- Mammakarzinomen sein (Yanai et al., 2014). Die Gabe von Everolimus ist beim metastasierenden ER+/HER2- -Mammakarzinom postmenopausaler Frauen in Kombination mit dem Aromatasehemmer Exemestan seit 2012 zugelassen (Lüdders, 2014). Für postmenopausale Frauen mit ER+/HER2- Brustkrebs ist des Weiteren seit Februar 2015 in den USA der Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6) Palbociclib in Kombination mit dem Aromatasehemmer Letrozol zugelassen. Unter Kombinationstherapie mit Palbociclib/Letrozol zeigte sich gegenüber einer Aromatasehemmermonotherapie eine signifikante Verlängerung des medianen progressionsfreien Überlebens (Finn et al., 2015; Law et al., 2015).

HER2+/(ER-)-Tumore treten bei 15–20% der Fälle auf und können mit monoklonalen Antikörpern wie Trastuzumab/Lapatinib/Pertuzumab behandelt werden (Clynes et al., 2000; Rimawi et al., 2015). Bei diesem Subtyp treten jedoch häufig Lymphknotenmetastasen auf, so dass die Prognose im Vergleich zu Luminal A und B verschlechtert ist (Wolff et al., 2007; Maciejczyk, 2013).

Für tripelnegative Mammakarzinome (ER-/ PR-/ HER2-), die in etwa 15% der Fälle diagnostiziert werden, gibt es derzeit keine zielgerichtete Standardtherapie und nur rund 20% dieses Subtyps sprechen auf eine Chemotherapie an. PatientInnen mit diesem Subtyp haben die schlechteste Prognose und versterben im Mittel früher als PatientInnen mit Mammakarzinomen anderen Subtyps (Dent et al., 2007; Nishimura & Arima, 2008; Parise et al., 2009; Polyak, 2011). Beim tripelnegativen Mammakarzinom kommt es im Vergleich zu anderen Subtypen innerhalb der ersten drei Jahre nach Erstmanifestation viermal häufiger zu Rezidiven. Außerdem zeigen sich eine höhere Metastasierungsrate und eine häufige Manifestation diagnostisch ungünstiger zerebraler Metastasen (Dent et al., 2007).

Die einzige Target-Therapie, die für das tripelnegative Mammakarzinom zur Ergänzung der klassischen Chemotherapie zugelassen ist, ist der antiangiogenetische Antikörper gegen VEGF (z. B. Bevacizumab). Eine signifikante Verbesserung des medianen progressionsfreien Überlebens zeigt sich nur bei der neoadjuvanten Therapie schon metastasierter Mammakarzinome, nicht aber bei adjuvanter Behandlung (Cameron et al., 2013; Gerber et al., 2013).

Das tripelnegative Mammakarzinom zeigt eine hohe Überschneidung mit dem basalen Mammakarzinom, kann aber nicht ganz mit ihm gleichgesetzt werden. Das tripelnegative Mammakarzinom wird weiter in bisher sechs Subtypen eingeteilt: Basal-like 1 Subtyp, Basal like 2 Subtyp, Immunmodulatory Subtyp, Mesenchymale Subtyp, Mesenchymal stem-like Subtyp und Luminal androgen receptor Subtyp (Peddi et al., 2012). Mit 70% weist der Basal like 1 Subtyp den größten Anteil der tripelnegativen Mammakarzinome auf. Er ist häufig mit dem Vorliegen einer BRCA1-Mutation assoziiert (Peddi et al., 2012). Umgekehrt entwickeln BrustkrebspatientInnen mit einer Mutation in BRCA1 oder BRCA2 meist ein Karzinom vom tripelnegativen Subtyp. Die Genprodukte von BRCA1/BRCA2 könnten einen neuen gezielten Behandlungsansatz von BRCA1-assoziierten tripelnegativen Mammakarzinomen darstellen (Blanchard et al., 2015; Telli & Sledge, 2015). Für high grade seröse Ovarialkarzinome mit Nachweis einer BRCA1/2-Mutation wurde kürzlich der PARP-Inhibitor Olaparib zugelassen. Eine ähnliche Effektivität von PARP-Inhibitoren bei Mammakarzinomen mit BRCA1/2-Mutation wird diskutiert (Bischoff, 2015; Kast & Rhiem, 2015; Oza et al., 2015).

Brustkrebszellen weisen jedoch noch weitere auf morphologischer, molekularer und genetischer Ebene, sowie auch durch die Dynamik der Tumor-Mikro-Umgebung bedingte Variationen auf, die es schwierig machen eine umfassende Klassifizierung vorzunehmen und eine einheitliche Therapie des Brustkrebses verkomplizieren bzw. unmöglich machen (Mego et al., 2010; Polyak, 2011; Polyak, 2014). Diese Heterogenität tritt nicht nur inter- sondern auch intrapersonell auf. Zwischen Primärtumor und Metastasen finden sich molekularpathologische Unterschiede, beispielsweise in der Expression von ER/PR (Ding et

al., 2010; Arslan et al., 2011; Somlo et al., 2011; Stähler & Kübler, 2013). Auch innerhalb eines Tumors können mehrere klonale Subpopulationen von unterschiedlicher Genomik auftreten (Navin et al., 2010; Navin et al., 2011). Eine immer größere Rolle für Diagnostik und Therapie spielen auch die Tumorstammzellen, die Einfluss auf die Metastasierung und Resistenzentwicklung gegen Therapeutika haben (Li et al., 2008; Marcato et al., 2009; Liu et al., 2015).

Therapeutisch führt diese Vielfalt an Variationen weg von einer standardisierten Chemotherapie hin zu einer zielspezifischen personalisierten Therapie, die im Laufe der Behandlung immer wieder angepasst werden muss (Karn et al., 2010; Mego et al., 2010; Higgins & Baselga, 2011).

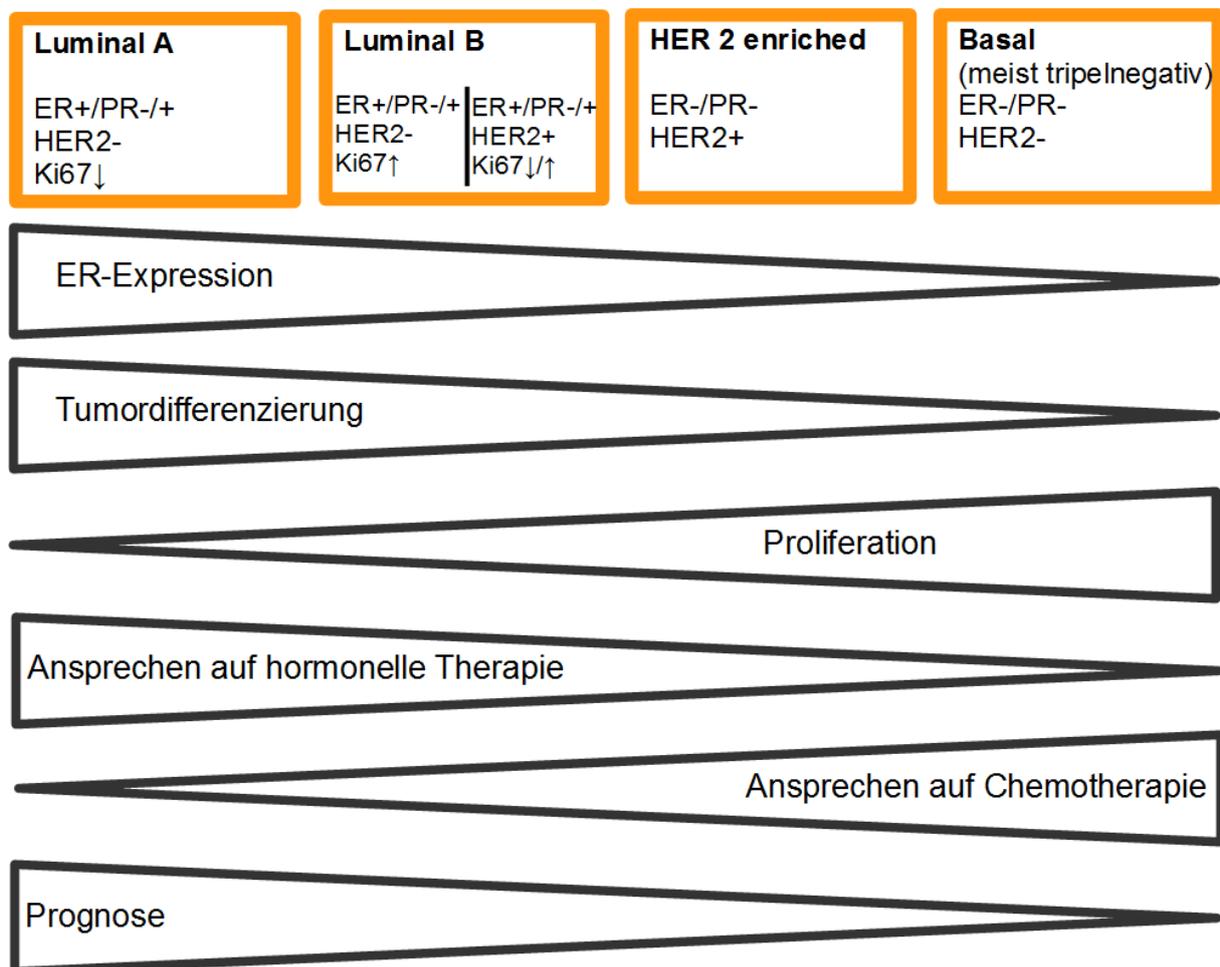


Abbildung 2: Vereinfachte Übersicht zur immunpathologischen Einteilung von Brustkrebs. In den orangefarbenen Kästen ist für jeden Typus des Brustkrebses angegeben, ob ER (Östrogenrezeptor), PR (Progesteronrezeptor) und HER2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-2) positiv oder negativ sind; und ob Ki67 hoch oder niedrig ist. Die Balken stellen diagnostische oder therapeutische Kriterien da, die von links nach rechts zu- oder abnehmen.

1.4 Cadherine

Der Name Cadherin ist eine Zusammensetzung der Worte Calcium und adhaerere, von lat. adhaerere – an etw. haften, was schon auf ihre zentrale Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion schließen lässt. Epithel- und Endothelzellen sind über „tight“- und „adherens junctions“ miteinander verbunden. Letztere werden durch Cadherine stabilisiert (Dejana, 2004). Cadherine sind transmembranäre Glykoproteine, die aus einer zytoplasmatischen, einer transmembranären und einer extrazellulären Domäne bestehen. Über ihre extrazelluläre Region am N-terminalen Ende vermitteln sie eine dynamische, homophile Ca^{2+} -abhängige Zell-Zell-Verbindung zwischen benachbarten Zellen (Takeichi, 1991; Kemler 1993; Birchmeier, 2005). Die Cadherin-Superfamilie unterteilt sich in verschiedene Subfamilien: klassische Cadherine, desmosomale Cadherine, atypische Cadherine, Protocadherine und cadherin-ähnliche Signalmoleküle (Foty & Steinberg, 2004; Gumbiner, 2005).

1.4.1 Klassische Cadherine

Die Subfamilie der klassischen Cadherine zählt etwa 20 Mitglieder, die in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden. In dieser Subfamilie besteht die extrazelluläre Domäne aus fünf sich wiederholenden Sequenzen EC1 - EC5 (Dejana et al., 2008; Vestweber, 2008; Meng & Takeichi, 2009). Die klassischen Cadherine können anhand des Vorhandenseins eines Histidin-Alanin-Valin (HAV)-Motives an der ersten extrazellulären Domäne EC1, die für die homophile Adhäsion zuständig ist, in Typ I und Typ II unterteilt werden (Nagar et al., 1996; Patel et al., 2006). Zum Typ I, die ein HAV-Motiv besitzen, gehören zum Beispiel Epitheliales(E)-, Neuronales(N)-, Plazentares(P)-, Retinales(R)- und Muskuläres(M)-Cadherin (van Roy, 2014). Das Vaskulär endotheliale(VE)-Cadherin gehört zum Typ II (Patel et al., 2006). Die intrazelluläre Domäne am C-Terminus ist über Catenine mit Aktinfilamenten assoziiert, sodass Cadherine eine direkte Verbindung zwischen Zelloberfläche und Zytoskelett darstellen (Ozawa et al., 1990; Wheelock et al., 2001; Gumbiner, 2005). β - und γ -Catenin (Plakoglobin), sowie das Protein p120 können auf der einen Seite mit der intrazellulären Cadherindomäne interagieren, auf der anderen mit α -Catenin, das wiederum eine dynamische Verbindung zum Zytoskelett herstellen kann (Wheelock et al., 2001; Holsinger et al., 2002; Drees et al., 2005; Meng & Takeichi, 2009).

Neben dieser mechanischen Funktion können Cadherine durch Interaktion mit verschiedenen Molekülen, die an Signaltransduktion beteiligt sind, auch Signalwege beeinflussen (Klymkowsky & Parr, 1995). So können beispielsweise Catenine dissoziieren, zum Zellkern wandern und dort die Genexpression beeinflussen (Corada et al., 2002). β -Catenin, das auch eine tragende Rolle im Wnt-Signalweg spielt, scheint dabei das für die Krebsentstehung wichtigste Catenin zu sein (Wagener & Müller, 2010).

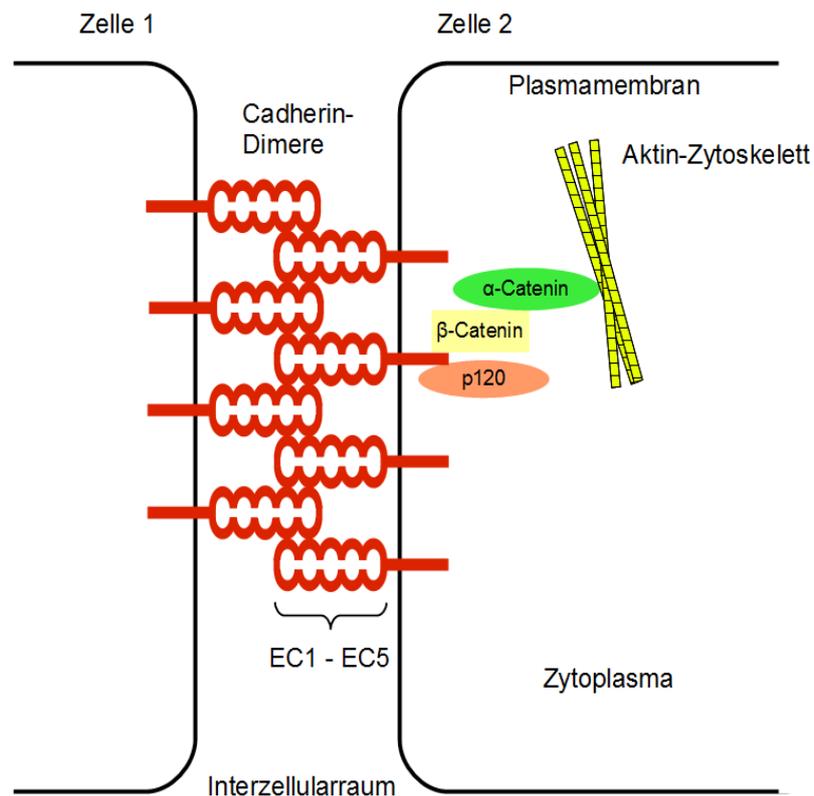


Abbildung 3: Adhärenzkontakt mit Dimeren klassischer Cadherine

Dargestellt ist der Aufbau eines Adhärenzkontaktes zwischen zwei benachbarten Zellen. Die klassischen Cadherine mit den fünf extrazellulären Domänen EC1-EC5 gehen eine homophile Bindung ein. Intrazellulär sind die Cadherine über p120, β- und α- Catenin mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Abbildung frei nach Kiener & Brenner, 2005.

Cadherine sind also maßgeblich an der Bildung von Adhärenzkontakten beteiligt, die die Zellen mechanisch zusammen halten und die strukturelle Grundlage für die Stabilität, Integrität und Polarität der Zellen und damit der Erhaltung der Gewebshomöostase bilden (Gumbiner, 2000; Bazzoni & Dejana, 2004; Berx & van Roy, 2009). Zusammen mit den Cateninen sind Cadherine auch an der Zell-Zell-Inhibition beim Zellwachstum und der Regulierung der Proliferation, Migration und Invasion beteiligt (Zhurinsky et al., 2000; Dejana, 2004). Cadherine spielen eine bedeutende Rolle in der Morphogenese. So partizipieren sie an der Induktion und Erhaltung von Zellerkennung, -sortierung und -bewegung (Wheelock & Johnson, 2003; Takeichi, 2011).

Eine unkontrollierte Cadherinexpression und -funktion kann aber auch zu pathologischen Prozessen wie Fibrosierung und Tumorprogression führen (Wheelock & Johnson, 2003). Ist zum Beispiel β-catenin nicht an Cadherine gebunden, kann es über den Wnt-Signalweg die Transkription von Protoonkogenen wie Cyclin-D1 und c-myc stimulieren, was auch bei der Brustkrebsentstehung eine Rolle spielt (Horst et al., 2009; Kim et al., 2013). α-, β-Catenin und p120 können über den bei Tumoren oft überaktivierten NF-κB-Signalweg das Zellüberleben beeinflussen (Stepniak et al., 2009; Schön et al., 2014).

Das klassische Cadherin E-Cadherin, das normalerweise in Epithelzellen vorkommt und Tumorwachstum und -metastasierung hemmt, kann im Prozess der EMT herunterreguliert werden, was zu einem invasiveren Phänotyp der Zellen führt (Bex & van Roy, 2009; Garcia de Herreros, 2014). Die Herabregulierung des E-Cadherin kann über die im Prozess der EMT aktivierten Transkriptionsrepressoren Snail, Slug, Twist und Zeb ausgelöst werden (Peinado et al., 2007). In einigen Brustkrebstypen wurden auch Mutationen des E-Cadherins gefunden (Bex & van Roy, 2009).

1.4.2 VE-Cadherin

Vaskulär endotheliales (VE)-Cadherin, auch als Cadherin-5 oder CD144 bezeichnet, gehört zu den klassischen Cadherinen des Typus II und wird spezifisch in Endothelzellen exprimiert (Breier et al., 1996; Dejana, 2004; Patel et al., 2006). Es ist in der Angiogenese, der Entwicklung der endothelialen Barrierefunktion und der Regulierung der vaskulären Morphologie, Stabilität und Permeabilität von großer Bedeutung (Breviario et al., 1995; Dejana, 2004; Bex & van Roy, 2009). Ein Fehlen von VE-Cadherin ist mit dem Leben nicht vereinbar. VE-Cadherin defiziente Mausembryos zeigen schwerwiegende Störungen in der vaskulären Entwicklung und sterben 9-10 Tage nach der Befruchtung *in utero* (Carmeliet et al., 1999; Dejana, 2004; Mehta & Malik, 2006). Dies liegt in der Apoptose endothelialer Zellen begründet, die durch das Fehlen von VE-Cadherin resistent gegenüber vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor-(VEGF)-induzierten Überlebenssignalen sind (Dejana et al., 2000). Über eine Assoziation mit dem VEGF-Rezeptor können des Weiteren proliferative Signalwege gehemmt und somit Kontaktinhibition vermittelt werden (Dejana, 2004; Dejana et al., 2008). VE-Cadherin interagiert auch mit verschiedenen anderen signalvermittelnden Molekülen, so zum Beispiel mit Entzündungsmediatoren wie Histamin und Thrombin, deren Kontakt dazu führt, dass die vaskuläre Permeabilität sinkt und Immunzellen durch das Endothel wandern können (Le Guelte et al., 2011). Über die Interaktion mit den Cateninen hat VE-Cadherin Einfluss auf Signalwege wie die Wnt-Signalkaskade (Ben Ze'ev & Geiger, 1998; Dejana et al., 1999).

Aufgrund ihrer tragenden Rolle in Zellerkennung, Adhäsion und Signalvermittlung können Veränderungen in der Expression und Funktion von VE-Cadherin auch pathologische Prozesse, wie die Tumorentstehung, beeinflussen (Wheelock et al., 2001). Eine vermehrte Expression von VE-Cadherin zeigt sich zum Beispiel in Brustkrebsblutgefäßen (Parker et al., 2004). Bei Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom wurden im Vergleich zu Patientinnen ohne Metastasen erhöhte VE-Cadherin-Spiegel im Serum gemessen (Fry, et al., 2013). VE-Cadherin ist im Tumorendothel präsent und kann die Tumorangio-genese fördern, woraus sich ein therapeutischer Angriffspunkt entwickelt könnte. Spezifische

Antikörper gegen VE-Cadherin können die Angiogenese und das Tumorwachstum hemmen (Liao, 2000). Antikörper gegen VEGF wie Bevacizumab oder Ramucirumab werden zum Beispiel bei fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und metastasiertem tripelnegativem Mammakarzinom als Zusatz zur Standardchemotherapie angewandt und verbessern das Überleben (Sandler et al., 2006, Garon et al., 2014; Lüdders, 2014).

VE-Cadherin wird aber erstaunlicherweise auch in Tumorzellen nicht-endothelialen Ursprungs wie Mammakarzinomen, Osteosarkomen und Melanomen aberrant exprimiert (Hendrix et al., 2001; Labelle et al., 2008; Zhang et al., 2010; Fry et al., 2013). VE- und N-Cadherin können in invasiven Mammakarzinomen koexprimiert werden (Labelle et al., 2008; Rezaei et al., 2012). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass VE-Cadherin über den TGF- β -Signalweg die Tumorprogression stimulieren kann (Labelle et al., 2008). In der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT zeigt eine Herabregulierung von VE-Cadherin ein signifikant verringertes Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen (Schmidt, 2014). Das alles könnte darauf hindeuten, dass VE-Cadherin nicht nur die Angiogenese, sondern durch Stimulierung der Migration und Invasion auch die Metastasierung fördert.

1.4.3 N-Cadherin

Das Neuronale(N)-Cadherin, das auch als Cadherin-2 bezeichnet wird, gehört wie auch das E-Cadherin zum Typ I der klassischen Cadherine (Patel, 2006). Es wurde zuerst an Neuronen entdeckt, kommt aber zum Beispiel auch an Endothelzellen, Fibroblasten, Skelett- und Herzmuskelzellen vor (Dejana, 2004; Mariotti et al., 2007). Im Gegensatz zu VE-Cadherin, das eine homophile Bindung in Adhäsionskontakten zwischen Endothelzellen vermittelt, kommt N-Cadherin nicht nur an Adhäsionskontaktstellen vor, sondern ist vielmehr diffus an der Plasmamembran verteilt und kann auch Kontakte zu anderen Zelltypen wie Perizyten vermitteln (Salomon et al., 1992; Giannotta et al., 2013). N-Cadherin scheint eine weniger stabile und dynamische Zelladhäsion als beispielsweise E-Cadherin zu vermitteln (Bixby & Zhang, 1990). Das N-Cadherin trägt zur Entwicklung und Erhaltung des Nervensystems, zur Entstehung von funktionalen neuronalen Synapsen, aber auch zur Gefäßwandentwicklung während der Angiogenese bei (Tanaka et al., 2000; Tillet et al., 2005; Mariotti et al., 2007). Des Weiteren kann N-Cadherin über die Expression von β 1-Integrin die endotheliale Zellproliferation beeinflussen (Luo & Radice, 2005). Eine kürzlich erschienene Publikation beschreibt die Rolle des N-Cadherin bei der Gliazellmigration bei *Drosophila in vivo*. Hier scheint N-Cadherin durch Interaktion mit α - β -Catenin das Zytoskelett zu verändern und die Migration negativ zu beeinflussen (Kumar et al., 2015). N-Cadherin defiziente Mausembryos sterben 10-11 Tage nach der Fertilisation an Herzfehlern. Ebenso sind die Bildung der Blutgefäße und des Dottersackes gestört (Dejana, 2004; Alberts

et al., 2011). Die endothelspezifische Deletion von N-Cadherin in einem sich entwickelnden Gefäßsystem führt zu einem Phänotyp, der dem VE-Cadherin defizienter Mäuse sehr ähnlich ist, was darauf schließen lassen könnte, dass N-Cadherin die Expression von VE-Cadherin reguliert (Carmeliet et al., 1999; Luo & Radice, 2005). Bei Endothelzellen führte die Herabregulierung von N-Cadherin mittels small interfering Ribonukleinsäure (siRNA) tatsächlich auch zu einer Herabregulierung von VE-Cadherin und p120ctn (Luo & Radice, 2005). Es scheint aber auch eine Regulierung des N-Cadherin durch das VE-Cadherin zu geben. So kontrolliert VE-Cadherin die Expression und Lokalisation von N-Cadherin an Adhärenzkontaktstellen (Mariotti et al., 2007; Giampietro et al., 2012).

N-Cadherin spielt wie VE-Cadherin nicht nur in physiologischen, sondern auch in pathologischen Prozessen eine Rolle. In Karzinomen ist N-Cadherin als „mesenchymales Cadherin“ bekannt, das während der EMT E-Cadherin ersetzt (Thiery et al., 2009; de Craene & Berx, 2013). N-Cadherin reguliert auch über β -Catenin die Genexpression (Zhang et al., 2010). Über Interaktion mit dem Fibroblasten-wachstumsfaktorrezeptor(FGFR)-1 kann N-Cadherin die Tumorprogression beeinflussen, und beispielsweise die Expression von MMP-9 heraufregulieren (Suyama et al., 2002; Sanchez-Heras et al., 2006; Mariotti et al., 2007). Einen weiteren Signalweg stimuliert N-Cadherin in Blasenkrebszellen über die PI3K/AKT-Kinase (Rieger-Christ et al., 2004). In Melanom- und Pankreastumorzelllinien beeinflusst N-Cadherin das Migrations- und Invasionsverhalten positiv (Sandig et al., 1997; Shintani et al., 2008; Su et al., 2012). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass N-Cadherindefizienz zu einem signifikant verringerten Mammakarzinomwachstum führt (Rezaei, 2011). Eine Überexpression von N-Cadherin bei schwach invasiven und kaum metastasierenden humanen Brustkrebszellen führt zur Entwicklung migratorischer und invasiver Fähigkeiten (Hazan et al., 2000). N-Cadherin scheint also auch bei der Progression und Metastasierung des Mammakarzinoms von Bedeutung zu sein.

All diese Entdeckungen weisen darauf hin, dass N-Cadherin – auch in der Interaktion mit anderen Cadherinen – eine zentrale Rolle in der Tumorprogression spielt. Es eröffnen sich hier interessante und realistische neue Möglichkeiten zur Verbesserung onkologischer Diagnostik und einer zielspezifischen Therapie.

2 Fragestellung

Die Mechanismen der Tumorprogression und -metastasierung sind trotz umfangreicher Studien zur Karzinogenese des Mammakarzinoms bisher noch nicht umfassend geklärt. Der aktuelle Trend zu verbesserten Überlebensraten bei MammakarzinompatientInnen ist größtenteils der Verbesserung der Brustkrebsfrüherkennung zuzuschreiben, während es therapeutisch, gerade bei der Behandlung tripelnegativer Mammakarzinome, immer noch nur begrenzte Möglichkeiten gibt. Tieferegehende Untersuchungen zur molekularen Grundlage der Brustkrebsprogression sind daher notwendig, um weitere zielspezifische Therapeutika zu entwickeln.

Bisherige Forschungsergebnisse lassen den Schluss zu, dass Cadherine auf verschiedenen Wegen Einfluss auf die Tumorprogression haben. N- und VE-Cadherin werden aberrant in murinem und humanem Brustkrebsgewebe exprimiert (Labelle et al., 2008; Rezaei et al., 2012). Bei Mausmammakarzinomzellen (Ex5ExTu Zellen) stimuliert VE-Cadherin über den TGF- β -Signalweg die Tumorprogression (Labelle et al., 2008). In der humanen Brustkrebszelllinie SUM149PT führt eine Defizienz von VE-Cadherin zu einer signifikanten Reduzierung des Migrations- und Invasionsverhaltens (Schmidt, 2014).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass N- und VE-Cadherin defiziente Tumore im Vergleich zu N- und VE-Cadherin exprimierenden Kontrollzellen ein signifikant verringertes Wachstum haben; und dass N-Cadherin die Expression von VE-Cadherin beeinflusst (Rezaei et al., 2012). Auch bei humanen epithelialen Tumorzellen wiesen verschiedene Studien darauf hin, dass eine Überexpression von N-Cadherin zu erhöhter Migration und Invasion führt (Hazan et al., 2000; Nagi et al., 2005). N-Cadherin scheint also einen bedeutenden Einfluss auf die Tumorprogression und -metastasierung zu haben, der näher erforscht werden muss. Die Möglichkeit, dieses Molekül als potenzielles Ziel einer targetspezifischen Tumortherapie zu gewinnen, wäre vor allem bei tripelnegativen Mammakarzinomen, die nicht auf eine hormonelle Therapie ansprechen, von großem Nutzen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle des N-Cadherin in humanen Mammakarzinomzelllinien zu untersuchen. Die Auswirkungen der Herabregulierung von N-Cadherin auf die Expression und Lokalisation anderer Cadherine und Auswirkungen auf die Tumorprogression in humanen Brustkrebszellen sollen hier *in vitro* untersucht werden.

Folgende Fragen wurden bearbeitet:

- 1.) Beeinflusst N-Cadherin die Expression und die subzelluläre Lokalisation von E- und VE-Cadherin in humanen Mammakarzinomzelllinien?
- 2.) Welche Auswirkungen hat eine Defizienz von N-Cadherin auf die Proliferation humaner Mammakarzinomzellen *in vitro*?
- 3.) Welche Auswirkungen hat eine Defizienz von N-Cadherin auf die Migration humaner Mammakarzinomzellen *in vitro*?
- 4.) Welche Auswirkungen hat eine Defizienz von N-Cadherin auf die Invasion humaner Mammakarzinomzellen *in vitro*?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

3.1.1.1 Inkubatoren

Inkubator/Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Wärmeschrank Typ B 15	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

3.1.1.2 Mikroskope

Axioplan 2 mit Kamera AxioCam MRc5	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Axiovert 200M mit Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland
Olympus CK 2	Olympus Optical GmbH, Tokyo, Japan
Olympus CKX41	Olympus Optical GmbH, Tokyo, Japan

3.1.1.3 Schüttler

Schüttler, Assistent 348/1	Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Vortex mixer SA8	VWR™ International GmbH, Dresden, Deutschland

3.1.1.4 Sterilisatoren

Decloaking Chamber Model DC 2002	Biocare Medical, Concord, USA
Dampfsterilisator MMM Unisteri	M Medizin Mechanik, München, Deutschland
Dampfsterilisator Varioclav® Typ 300 EP Z2	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland

3.1.1.5 Zentrifugen

Tischzentrifuge 1 Biofuge pico	Heraeus, Osterode, Deutschland
Tischzentrifuge 2 Eppendorf Centrifuge 5402	Eppendorf Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Deutschland; Rotorradius: 7,2 cm; 12.000 rpm=11.600 rcf (g)
Tischzentrifuge 3 Eppendorf Centrifuge 5702	Eppendorf Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 4 Megafuge Model 1.0	Heraeus, Osterode, Deutschland

3.1.1.6 Sonstiges

Blottingerät GPS 200/400	Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden
Blottingkammer Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Eismaschine S-NO 094636	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isenhagen, Deutschland
Electrophoresegerät PowerPac™ Basic (300 V, 400 mA, 75 W)	Bio-Rad, München, Deutschland
Freezing Container NALGENE™ Mr. Frosty™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Microplate Reader Sunrise™	Tecan Group AG, Grödig, Österreich
Molecular Imager® Chemidoc™ XRS System 170-8070/170-8071	Bio-Rad, München, Deutschland
PCR-Gerät DNA Engine Tetrad® 2 Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
q-PCR-Gerät LightCycler® 480 Instrument, 96-well	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Pipetten, 2,5/10/100/1000 µl, Easypet	Eppendorf Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipette Finnpiquette 5 ml	Thermo Labsystems Oy, Vantaa, Finnland

Spectrophotometer ND-1000 Nano Drop	PeQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Spülmaschine H01 Microprocessor Control	Netzsch-Newamatic GmbH, Waldkraiburg, Deutschland
Sterilbank LaminAir HB 2448	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Waage VWR® 1502	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserreiniger WW	Weinert Wasser, Dresden, Deutschland
Zellzähler Casy 1 Model 1 TTC	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Casy Tubes + Ton	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
C.B.S.Mini, 1 mm Spacer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Chamber Slides Lab-Tek® Chamber Slide™ Tissue Culture Chambers, 4 Well	Nunc, Inc., Naperville, U.S.A.
Deckgläser 20x20 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser 24x60 mm	Süsse Labortechnik GmbH, Gudensberg, Deutschland
FALCON® HTS Fluoro Blok™ Inserts, 8 µm Porengröße	Becton Dickinson & Company, Le Pont de Claix, Frankreich
Filterpapier Mini Trans-Blot® 7,5x10 cm	Bio-Rad, München, Deutschland
Handschuhe Mikro Touch Coated	Ansell, Tamworth, UK
Handschuhe Powder-Free KC 300	STERLING * NITRILE, Roswell, USA
Ibidi 30µ-Dish 35mm high Culture-Insert	ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
Kanülen 20 G x 1 ½ -Nr 1; 0,9 mm x 40 mm	Becton Dickinson & Company, Huesca, Spanien

Nitrocellulose Transfer Membrane Protan®	Whatman® GmbH, Dassel, Deutschland
Petrischalen Cellstar Tissue Culture Dishes	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard 0,5-20/2-200/20-300/50-1000 µl	Eppendorf Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt Ag&Co., Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen 2,5/200 µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen costarSTIPETTE 25/50 ml	Corning® Incorporated; New York, USA
PCR Single Cap 8er-Soft-Strips 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Röhrchen Safe Lock 0,5 ml	Eppendorf Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Deutschland
Röhrchen zum Einfrieren Cellstar Cryo.S	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Röhrchen 15/50 ml Cellstar Tubes	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Röhrchen 50 ml	Corning® CentriStar™, New York, USA
Spritze 1 ml	Becton Dickinson & Company, Madrid, Spanien
Wellplatten Cellstar® TC Plate, sterile (6 well, 24 well and 96 well plates)	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen Cellstar Tissue Culture Flasks 25/75 cm ²	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber Cell Scraper	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland

3.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Kits

5x First Strand Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Acrylamide/Bis Solution 29:1 (30%w/v;3,3%C)	SERVA Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
Agarose, 3:1 high resolution blend	amresco®, Solon, Ohio, USA
Agarose A9539 BioReagent, for molecular biology, low EEO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Albumin bovine Fraction V (BSA), pH 7.0, standard grade, lyophile	SERVA Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
BCA™ Protein Assay kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
BD Matrigel™ Matrix Basement Membrane (8,4 mg/ml)	Becton, Dickinson and Company, Erembodegem, Belgien
Borsäure	VWR International S.A.S., Haasrose, Belgien
Calcium Chlorid Dihydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Complete™ Boehringer-inhibitor Cocktail	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Diamidinphenylindol (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Desoxycholsäure	SERVA Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP), Desoxyguanintriphosphat (dGTP), Desoxycytosintriphosphat (dCTP) PCR Grade, Na-salt; 100 mM	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulphoxid (DMSO) Hybri-Max® 100 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Dithiothreitol (DTT); 0,1 M	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethanol absolut	VWR BDH PROLABO, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Ethidiumbromid 1x 10 mg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	VWR BDH PROLABO, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Farbstoff HD Green Plus DNA Stain	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Fermacidal D2	Heraeus, IC Products SA, Minusio, Schweiz
Flexi Buffer 5x Green GoTaq®	Promega, Madison, USA
Gene MATRIX Universal RNA Purification kit (100)	EURx Ltd. Roboklon GmbH, Gdansk, Polen
Glycerol	Klinik-Apotheke des Uniklinikums, Dresden, Deutschland
Glycin	MERCK kGaA, Darmstadt, Deutschland
GoGreen20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
HD Green™ Plus DNA Stain	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
HiPerSolv CHROMANORM for High-performance liquid chromatography (HPLC)	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Isopropanol (propan-2-ol)	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Promega, Madison, USA
Marker 100 Basenpaar DNA	amresco®, Solon, Ohio, USA
Marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad, München, Deutschland
Marker Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards, 250 µl	Bio-Rad, München, Deutschland

β-Mercaptoethanol	Böhringer, Mannheim, Deutschland
microzid® AF liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Milchpulver, Blotting grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	MERCK kGaA, Darmstadt, Deutschland
Nonidet® P40	Fluka AG, St . Gallen, Schweiz
NU Page sample Reducing Agent (10x) and LDS Sample buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Paraformaldehyde reagent grade, crystalline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS) Dulbecco, 9,55 g/l. w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland
PBS Tablets steril, 1 für 200 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Random Hexamer Primer	Roche, Mannheim, Deutschland
RNAasin® Ribonukleaseinhibitor	Promega, Madison, USA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Klinik-Apotheke des Uniklinikums, Dresden, Deutschland
Slow Fade® Gold antifade reagent	Life Technologies GmbH, invitrogen™ Molecular Probes®, Eugene, Oregon, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS) Ultra Pure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Superscript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Life Technologies GmbH, Applied Biosystems™, Darmstadt, Deutschland
Taq-Polymerase GoTaq® DNA Polymerase, 5 u/μl	Promega, Madison, USA

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH Co. Kg, Karlsruhe, Deutschland
Trishydroxymethyl-aminomethan (Tris) Puffer	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton® X-100 Alkylphenylpolyaethylenglycol	Ferak Laborat GmbH, Berlin, Deutschland
Trypanblau Blue Stain (0,4%)	Gibco, New York, USA
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tween-20	SERVA Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
West Femto	Thermo Scientific, Rockford, USA

3.1.4 Puffer, Ansätze und Gele

3.1.4.1 Puffer für Western Blot

WB-Antikörperverdünnungs-Lösung	PBS 0,01% Tween 0,5% Milchpulver
Blockingpuffer	PBS 0,01% Tween 5% Milchpulver, fettarm (w/v) Antikörperverdünnung: 1:10 Verdünnung mit PBS-Tween (0,5% Milchpulver)
10x Blottingpuffer	390 mM Glycin 480 mM Tris Doppelt destilliertes Wasser (ddH ₂ O) Verwendet : 10% of 10x Blotting buffer 20% Methanol (v/v) (in ddH ₂ O)
PBS-Tween	PBS 0,1% Tween 20

Protein Lysepuffer	50 mM Tris-HCL, pH 7,4 0,1% Nonidet® P40 0,25% Sodiumdesoxycholat 150 mM NaCl 1 mM EDTA 40 µl Complete™/ml Lysepuffer
1x SDS Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS ddH ₂ O
0,5x TBE Puffer	89 mM Tris 89 mM Borsäure 50 mM EDTA Mit ddH ₂ O auf 1 l aufgefüllt

3.1.4.2 Puffer für Immunfluoreszenz

PBS-CaCl ₂	PBS 1 mM CaCl ₂
PBS-Triton	PBS 1 mM CaCl ₂ 0,2% Triton
PBS-Tween	PBS 0,1% Tween 20
IF-Antikörperverdünnungs-Lösung	PBS 0,5% BSA Fraktion V 0,5% Tween 20
IF-Block-Lösung	PBS 5% BSA 0,2% Triton

3.1.4.3 Ansätze für cDNA-Synthese

dNTP Mastermix	2,5 mM von jedem dNTP (dATP; dCTP; dGTP; dTTP) in HPLC-Wasser (zusammen: 10 mM)
cDNA-Ansatz für eine Probe mit Enzym in 20 µl	5x First Strand Buffer (Kit; 4 µl) 2 µg Random Primer (Roche; 1 µl der Primerlösung (2 µg/µl)) 40 µM von jedem dNTP (1 µl dNTP Mastermix) 2 U RNAsin® Ribonuklease Inhibitor RNAsin (Promega; 1 µl der Lösung; 40 U/µl) 5 mM DTT (Kit; 1 µl: 0,1 M) Transkriptase Superskript™ II (Kit; 1 µl)
cDNA-Ansatz für eine Probe ohne Enzym in 20 µl (Negativkontrolle)	5x First Strand Buffer (Kit; 4 µl) 2 µg Random Primer (Roche; 1 µl der Primerlösung (2 µg/µl)) 40 µM von jedem dNTP (1 µl dNTP Mastermix) 2 U RNAsin® Ribonuklease Inhibitor RNAsin (Promega; 1 µl der Lösung; 40 U/µl) 5 mM DTT (Kit; 1 µl: 0,1 M) HPLC water (VWR; 1 µl)

3.1.4.4 Ansätze für klassische PCR

PCR-Ansatz für eine Probe in 20 µl	1x Flexi Buffer Green GoTaq 200 µM dNTP Mastermix 1,5 mM MgCl ₂ 650 nM Primer forward 650 nM Primer reverse 1 U Taq-Polymerase GoTaq® DNA Polymerase Mit HPLC-Wasser auf 19 µl aufgefüllt
------------------------------------	--

3.1.4.5 Gele

5% Sammelgel	120 mM Tris/HCl 6,8 5% Acrylamid 1% Glycerol 0,1% SDS 0,2% APS 0,16% TEMED Mit ddH ₂ O auf 2 ml aufgefüllt
8% Trenngel	750 mM Tris/HCl pH 8,8 8% Acrylamid 1% Glycerol 0,1% SDS-Buffer 0,2% APS 0,16% TEMED Mit ddH ₂ O auf 7,5 ml aufgefüllt. Überschichtung mit Isopropanol.
1,5% / 2% Agarosegel	1,5 g/2 g Agarose 100 ml 0,5% TBE

3.1.5 Antikörper

3.1.5.1 Primäre Antikörper

Monoclonal rabbit anti-E-cadherin (EP700Y)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Purified Mouse Anti-N-Cadherin, 50 µg, 0,2 ml, 250 µg/ml	BD Transduction Laboratories™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
VE-cadherin (F-8) mouse monoclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
VE-Cadherin (C-19): sc 6458	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Polyclonal rabbit anti-actin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

3.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Donkey ECL anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase (HRP)	GE Healthcare, Toronto, Canada
Anti-mouse IgG, affinity purified horse HRP-conjugate	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate, 5000x, 0,125 ml	Bio-Rad, München, Deutschland
AlexaFluor® 594 chicken, anti-rabbit IgG (H&L)	Life Technologies GmbH, invitrogen™ Molecular Probes®, Eugene, Oregon, USA
AlexaFluor® 594 chicken, anti-mouse IgG (H&L) 2 mg/ml	Life Technologies GmbH, invitrogen™ Molecular Probes®, Eugene, Oregon, USA
AlexaFluor® 594 rabbit, anti-goat IgG (H&L)	Life Technologies GmbH, invitrogen™ Molecular Probes®, Eugene, Oregon, USA

3.1.6 Primer

E-cad2-hu-fr; 5'-TCC ACA GCC ACC GTC ACC GT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
E-cad2-hu-rev; 5'-GCC CAC GCC AAA GTC CTC GG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
f-h-N-cadherin2; 5'-CAC TGC TCA GGA CCC AGA T-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
r-h-N-cadherin2; 5'-TAA GCC GAG TGA TGG TCC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
hVE-cadherin-fr; 5'-GGC CTG TGT TCA CGC ATC GGT TGT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
hVE-cadherin-re; 5'-GTT CTG GGG CTC ATC TGG GTC CTC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

TaqMan® Sonden

E-Cadherin, CDH1 Hs01023894_m1	Life Technologies GmbH, Applied Biosystems™, Darmstadt, Deutschland
N-Cadherin, CDH2 Hs00983056_m1	Life Technologies GmbH, Applied Biosystems™, Darmstadt, Deutschland
VE-Cadherin, CHD5 Hs00901463_m1	Life Technologies GmbH, Applied Biosystems™, Darmstadt, Deutschland
Referenzgen TBP Hs00427620_m1	Life Technologies GmbH, Applied Biosystems™, Darmstadt, Deutschland
Referenzgen PPIA Hs99999904_m1	Life Technologies GmbH, Applied Biosystems™, Darmstadt, Deutschland

3.1.7 Zellkultur**3.1.7.1 Medium und Medienzusätze**

Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/ Ham's F12 (1:1) (1x)	Gibco Life Technologies GmbH, Grand Island, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Kulturmedium

DMEM (3,151 g/l Glucose) / F12	DMEM /Ham's F12 Enthält: 15 mM HEPES 2,5 mM L-Glutamin Zugabe von: 5%, 10% bzw. 20% FKS Lagerung: 4°C
--------------------------------	---

3.1.7.2 Verwendete Zelllinien

Die Zelllinie SUM149PT wurde 1999 von Steve Ethier aus einem invasiven duktalem entzündlichen primären Mammakarzinom gewonnen. Sie ist negativ für Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie für HER2 und wurde als basale/tripelnegative Brustkrebszelllinie definiert (Ignatoski & Ethier, 1999; Hoffmeyer et al., 2005; Keller et al., 2010; Stewart et al., 2012). Vertrieb: Asterand®, Detroit, USA

Die N-Cadherin-Knock-down-Klone Sh-14I-3 und Sh-14I-12; im Folgenden als Sh-N-cad-3 und Sh-N-Cad-12 bezeichnet; sowie die Kontrollen Scr2_2 und Scr2_6 wurden von A. Klawitter und Dr. rer. medic. M. Grosser (Institut für Pathologie, Dresden; Bereich Forschung) aus den SUM149PT durch virale Transduktion mit kurzer Haarnadel-Ribonukleinsäure (shRNA) hergestellt, und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Herstellung des lentiviralen Vektors sowie die Transduktion in die humanen Brustkrebszellen werden von Rezaei und Kollegen beschrieben (Rezaei et al., 2012).

Die Zelllinie BT-20 isolierten Lasfargues und Ozzello 1958 aus einem invasiven duktalem Mammakarzinom einer 74jährigen Patientin (Lasfargues & Ozzello, 1958). Vertrieb: CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland

Alle Zelllinien wurden zu Beginn der Arbeiten auf Mykoplasmen getestet und für negativ befunden.

Als Kontrollen für Western-Blot und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden Protein und cDNA der aus einem humanen duktalem Mammakarzinom isolierten Epithelzelllinie T47D, sowie der humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) eingesetzt. Die Proben wurden freundlicherweise von A. Klawitter zur Verfügung gestellt.

3.1.8 Software

AxioVision 4.5	Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland
ImageJ	Wayne rasband (NIH), Bethesda, USA
Magellan™ - Data Analysis Software	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Microsoft Office 2007/2013	©2012 Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nanodrop ND1000 V3.3.0	NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA
Quantity one® 1-D Analysis Software	Bio-Rad, Hercules, USA
TSO-Vidmess	TSO Thalheim Specialoptik GmbH, Pulsnitz, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Arbeiten mit der Zellkultur erfolgten stets unter sterilen Bedingungen, unter einer Sicherheitswerkbank und mit sterilen Materialien und Lösungen. Die Kultivierung aller Zelllinien fand in Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12 (DMEM/F12) 1:1 bei 37°C und 5% CO₂ statt. Dem Medium für SUM149PT und den aus dieser Zelllinie hervorgegangenen Klonen wurde 10% Fetales Kälberserum (FKS), dem für BT-20 5% FKS zugesetzt. In T25-Kulturflaschen wurden die Zellen in je 5 ml Kulturmedium, in T75-Zellkulturflaschen in 15 ml Kulturmedium gehalten. Medium und FKS wurden bei 4°C gelagert und vor Gebrauch im Inkubator auf etwa 35°C erwärmt. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Das Passagieren der Zellen fand nach Erreichen einer Konfluenz von 80-100% statt. Dabei wurde das alte Medium verworfen und die Zellen zweimal mit 2 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA) wurden die Zellen für 5–15 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um ein Ablösen der Zellen vom Flaschenboden zu bewirken. Die Reaktion wurde mit 5 ml frischem Kulturmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 5 min bei 1000 rpm (200 g; Tischzentrifuge 3 siehe 3.1.1.5) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen und je nach Wachstumsverhalten der jeweiligen Zelllinie ein Drittel bis ein Fünftel der Suspension in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Die oben genannten Milliliterangaben beziehen sich auf T25-Zellkulturflaschen. Das Procedere bei Nutzung von T75-Zellkulturflaschen bleibt das gleiche; allerdings waren zum Waschen 5 ml PBS, zum Ablösen der Zellen 2,5 ml Trypsin/EDTA und zum Abstoppen der Trypsinreaktion 7,5 ml Kulturmedium notwendig.

Zur langfristigen Aufbewahrung wurde das Zellpellet in gekühltem Einfriermedium, bestehend aus 50% DMEM/F12, 30% FKS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. In einer Konzentration von etwa 1 Million/ml wurden die Zellen in 1 ml-Kryoröhrchen in einer Einfrierbox über Nacht bei -80°C gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die aufgetaute Suspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und dazu tropfenweise 5 ml Kulturmedium gegeben. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand zügig verworfen, das Pellet in frischem Kulturmedium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Die für Versuchsansätze benötigten Zellen, wurden nach Färbung mit Trypanblau

zunächst mit Hilfe der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt, bevor die jeweils benötigte Verdünnung hergestellt wurde.

3.2.2 Proteinisolierung und Western Blot

Um im Rahmen der Zellcharakterisierung die Proteinkonzentration von E-, N- und VE-Cadherin in den BT-20, den SUM149PT, sowie deren N-Cadherin-Knock-Down-Klonen und Scramble-Kontrollen zu bestimmen und zu vergleichen, wurden die im Folgenden kurz erläuterten biochemischen Methoden verwendet.

3.2.2.1 Proteinisolierung

Mit dem Ziel der Protein-Gewinnung wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, bis eine Konfluenz von 95-100% erreicht war. Das Kulturmedium wurde verworfen und die Schalen auf Eis gestellt, bevor dreimal mit 2 ml 4°C kaltem PBS gewaschen wurde. Anschließend wurde pro Petrischale 1 ml Lysepuffer (siehe 3.1.4.1) auf die Zellen gegeben und selbige mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Eine Homogenisierung des Lysats erfolgte durch 20maliges Resuspendieren mit einer Spritze. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Proben bei 12.000 u/min und 4°C für 5 min zentrifugiert (Tischzentrifuge 2, 3.1.1.5). Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Sofern die Proben nicht direkt weiterer Verwendung zukamen, fand eine Lagerung bei -80°C statt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA™ Protein assay kits II.

3.2.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden (Laemmli, 1970). Dazu wurden je 50 µg Protein jeder Zelllinie nach Herstellerangaben mit NU Page sample Reducing Agent und LDS Sample buffer versetzt, für 5 min bei 99°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Als Positivkontrolle für E-Cadherin wurden 50 µg Protein der epithelialen Zelllinie T47D, als Positivkontrolle für N- und VE-Cadherin 12,5 µg Protein der Endothelzellen HUVEC mitgeführt.

Von jeder Probe wurden 10 µl in die Taschen eines SDS-Gels, bestehend aus einem 5% Sammelgel und einem 8% Trenngel (siehe 3.1.4.5), pipettiert. Als Marker kam ein Precision Plus Protein™ Dual Color Standardmarker zum Einsatz. Die Elektrophorese fand in einem SDS-Laufpuffer (siehe 3.1.4.1) für 2 h bei 120 V statt. Hernach wurde das Gel vorsichtig aus der Gelkassette gelöst und für den Western Blot verwendet.

3.2.2.3 Western Blot

Um die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen und im Anschluss nachzuweisen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Gel und Membran wurden wie in Abbildung 4 ersichtlich zwischen Filterpapier und porösen Kissen zwischen Anode und Kathode geklemmt. Die Elektrophorese fand in Blottingpuffer (siehe 3.1.4.1) für 2 h bei 100 mA statt.

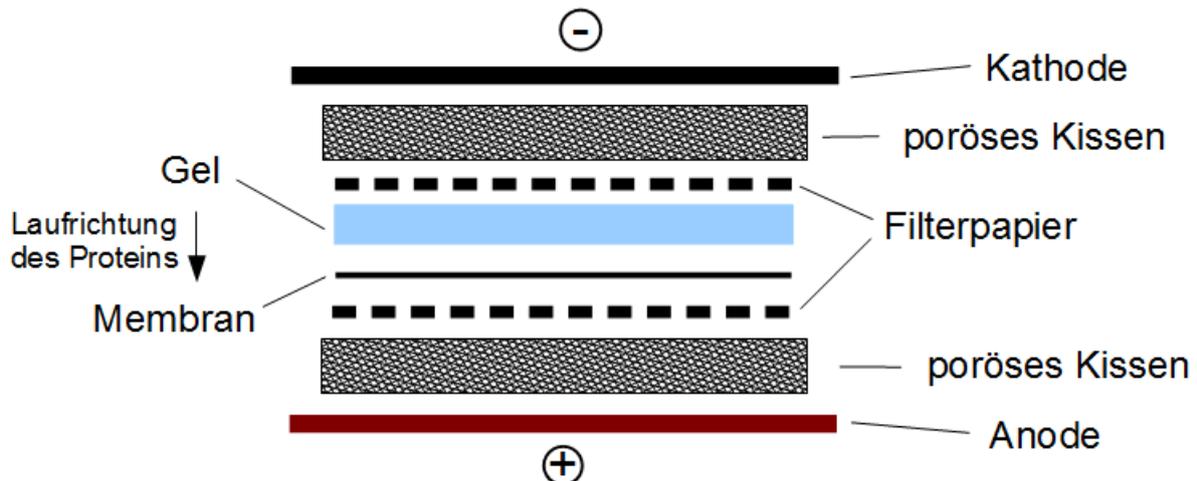


Abbildung 4: Aufbau des Western Blots

Um einer unspezifischen Bindung der Antikörper vorzubeugen, wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit Blockingpuffer (siehe 3.1.4.1) inkubiert. Hernach wurde der Primärantikörper in seiner jeweiligen Verdünnung (siehe Tabelle 1) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C auf den Schüttler gestellt. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit PBS-Tween gewaschen, bevor der jeweilige Sekundärantikörper in Western-Blot(WB)-Antikörperverdünnungs-Lösung (siehe Tabelle 1) zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Hernach wurde erneut dreimal für 10 min mit PBS-Tween gewaschen.

Um die Proteinbanden von E-, N- bzw VE-Cadherin sichtbar zu machen, wurde 1 ml SuperSignal® WestFemto Maximum sensitivity Substrat auf die Membran gegeben, für 5 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit einwirken lassen und mit Hilfe des Molecular Imager® Chemidoc™ XRS betrachtet und fotografiert.

Mit der gleichen Membran wurde anschließend das Prozedere erneut mit einem Primärantikörper gegen das Haushaltsprotein β -Aktin bzw. β -Tubulin durchgeführt, um nachzuweisen, dass von allen Zelllinienproben die gleiche Menge an Protein verwendet wurde.

Zielprotein	Primärantikörper	Verdünnung in WB-AK-Verd.-Lsg	Sekundärantikörper	Verdünnung in WB-AK-Verd.-Lsg
E-Cadherin	Monoclonal rabbit anti-E-cadherin (Novus Biologicals)	1:10 000	Donkey ECL anti-rabbit IgG HRP (GE Healthcare)	1:5000
N-Cadherin	Purified Mouse Anti-N-Cadherin, (BD Transduction Laboratories™)	1:5000	Anti-mouse IgG, affinity purified horse HRP (Cell Signaling Technology)	1:5000
VE-Cadherin	VE-cadherin (F-8) mouse monoclonal IgG (Santa Cruz)	1:1000	Anti-mouse IgG, affinity purified horse HRP (Cell Signaling Technology)	1:5000
β-Aktin	Polyclonal rabbit anti-actin (Sigma-Aldrich)	1:5000	Donkey ECL anti-rabbit IgG HRP (GE Healthcare)	1:5000

Tabelle 1: verwendete Antikörper zur Durchführung des Western Blots

Abkürzungen: AK: Antikörper; WB: Western Blot.

3.2.3 RNA-Isolierung und Polymerasekettenreaktion

Um im Rahmen der Zellcharakterisierung die Ribonukleinsäure(RNA)-Konzentration von E-, N- und VE-Cadherin in den BT-20, den SUM149PT, deren N-Cadherin-Knock-Down-Klonen und Scramble-Kontrollen zu bestimmen und zu vergleichen, wurden die im Folgenden kurz erläuterten molekularbiologischen Methoden verwendet.

3.2.3.1 RNA-Isolierung

Mit dem Ziel der RNA-Gewinnung wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium in Petrischalen mit je 6 cm Durchmesser ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, bis eine Konfluenz von 95-100% erreicht war. Hernach wurden die Schalen auf Eis gestellt und dreimal mit 1 ml 4°C-kaltem PBS gewaschen, bevor je 400 µl des mit 1% β-Mercaptoethanol versetzten RL-Puffers (GeneMATRIX Universal RNA Purification kit) auf die Zellen gegeben wurde, um die Lyse der selbigen zu veranlassen. Das Ablösen der Zellen von der Petrischale erfolgte durch die Nutzung eines Zellschabers. Mit einer Spritze wurde das Lysat in einem Eppendorfröhrchen durch 20-maliges Resuspendieren homogenisiert. Nach der RNA-Isolierung nach Angaben des Herstellers (GeneMATRIX Universal RNA Purification kit,

Version 2.3., Roboklon GmbH) erfolgte die Überprüfung der RNA-Konzentration und -Reinheit durch Messung der optischen Dichte mit dem Spektrophotometer (Nanodrop) bei 260 und 280 nm.

3.2.3.2 cDNA-Synthese

Als Ausgangsmenge für die Umschreibung der RNA in Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) mit Hilfe der Reversen Transkriptase SuperScript® II dienten je 500 ng RNA. Das ermittelte RNA-Volumen wurde in einem Eppendorfröhrchen mit A. dest. auf je 12 µl aufgefüllt, für 10 min bei 70°C im Thermoblock inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. In jede Probe wurden 8 µl des Mastermix (siehe 3.1.4.3) gegeben. Um eine mögliche Verunreinigung der RNA durch genomische DNA zu detektieren, wurde für jede Probe noch ein zusätzliches Röhrchen als Negativkontrolle angesetzt, bei der keine Zugabe der Reversen Transkriptase SuperScript® II erfolgte (siehe 3.1.4.3). Nach einer Inkubation im Thermomixer von 1 h bei 42°C wurden die Proben erneut kurz auf Eis gestellt und herunterzentrifugiert. Sofern die erhaltene cDNA nicht sofort weiterer Verwendung zukam, fand eine Lagerung bei -20°C statt.

3.2.3.3 RT-PCR und Gelelektrophorese

Für den Ansatz der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde je 1 µl cDNA in einem PCR-Röhrchen mit 19 µl Mastermix (siehe 3.1.4.4) versetzt. Die PCR-Röhrchen wurden in den Peltier Thermocycler gegeben und die Reaktion in teilweise leicht voneinander abweichenden Programmen gestartet (siehe Tabelle 3). Alle Programme setzen sich aus 6 Schritten zusammen, wobei die Schritte 2–4, die der Denaturierung der cDNA, der Primerhybridisierung und Elongation entsprechen, 20–30-mal wiederholt werden (Schmidt & Rothhämel, 2012). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Primer	DNA-Sequenz von 5' nach 3'
E-cad2-hu-fr; E-cad2-hu-rev	5'-TCC ACA GCC ACC GTC ACC GT-3' 5'-GCC CAC GCC AAA GTC CTC GG-3'
f-h-N-cadherin2; r-h-N-cadherin2	5'-CAC TGC TCA GGA CCC AGA T-3' 5'-TAA GCC GAG TGA TGG TCC-3'
hVE-cadherin-fr; hVE-cadherin-re	5'-GGC CTG TGT TCA CGC ATC GGT TGT-3' 5'-GTT CTG GGG CTC ATC TGG GTC CTC-3'
GAPDH 938-fr; GAPDH-rev	5'-TGA'AGG TCG GAG TCA ACG GAT TGG GT-3' 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'

Tabelle 2: verwendete Primer mit DNA-Sequenzen.

Alle Primer wurden bezogen von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s/min)	Wiederholungen
E-/N-Cadherin	1	94	2 min	Schritte 2–4: 25 Zyklen
	2	94	15 s	
	3	62	20 s	
	4	72	10 s	
	5	72	10 min	
	6	12	-	
VE-Cadherin	1	94	2 min	Schritte 2–4: 30 Zyklen
	2	94	15 s	
	3	62	20 s	
	4	72	10 s	
	5	72	10 min	
	6	12	-	
GAPDH	1	94	2 min	Schritte 2–4: 20 Zyklen
	2	94	30 s	
	3	68	30 s	
	4	72	1 min	
	5	72	10 min	
	6	12	-	

Tabelle 3: PCR-Programme

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese analysiert. Je 10 µl der DNA-Proben wurden in die Taschen eines 1,5% Agarosegels (siehe 3.1.4.5), das mit HD Green™ Plus DNA Stain (5 µl/100 ml Agarosegel) versetzt worden war, pipettiert. Als Marker kam ein 100 Basenpaar DNA Marker zur Verwendung. Das Gel wurde mit 0,5x TBE-Puffer (siehe 3.1.4.1) überschichtet. Nach einer Laufzeit von 30 min bei 140 V konnten die entstandenen Banden im Molecular Imager®Chemidoc™ sichtbar gemacht werden.

3.2.3.4 Quantitative PCR

Für den Ansatz zur Bestimmung der cDNA-Konzentration mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (q-PCR) wurde je 1 µl cDNA mit 3,5 µl A. dest. 0,5 µl 20x TaqMan Assay Sonde (siehe Tabelle 4) sowie 5 µl TaqMan Gene Expression Mastermix versetzt, so dass ein Gesamtansatz von 10 µl pro Probe zur Verwendung kam. Die Proben wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Platte in den Lightcycler® 480 gegeben. Als Referenzgene wurden Peptidylprolylisomerase A (PPIA) und TATA-Bindungsprotein (TBP) eingesetzt. Die Denaturierung der Proben erfolgte für 10 min bei 95°C, die Amplifizierung 45x bei je 95°C für 15 s und bei 60°C für 1 min. Anschließend wurde etwa 1 min bei 40°C heruntergekühlt. Von jeder Probe erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung.

Zielgen	TaqMan®Sonden-Identifikation
E-Cadherin, CDH1	Hs01023894_m1
N-Cadherin, CDH2	Hs00983056_m1
VE-Cadherin, CHD5	Hs00901463_m1
Referenzgen TBP	Hs00427620_m1
Referenzgen PPIA	Hs99999904_m1

Tabelle 4: TaqMan® Sonden.

Alle Sonden wurden von Life Technologies GmbH, Applied Biosystems™, Darmstadt, Deutschland bezogen

Die Auswertung erfolgte über relative Quantifizierung mit Hilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode nach Pfaffl (Pfaffl, 2004). Der CT-Wert ist der Zyklus, bei dem sich während der q-PCR das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt (Holzapfel & Wickert, 2007). Von den je zwei erhaltenen CT-Werten einer Probe wurde die mittlere Abweichung berechnet. Betrug diese mehr als 0,25 wurde erneut getestet. Bei 45 PCR-Zyklen kann ab einem CT-Wert von 35 davon ausgegangen werden, dass die Molekülzahl des zu bestimmenden Gens so gering ist, dass mit dieser Methode keine Expression desselbigen nachweisbar ist.

Der erste Schritt der Berechnung der relativen Genexpression ist die Normierung, die durch Subtraktion des CT-Wertes des Referenzgens vom CT-Wert des Zielgens erfolgt:

$$\Delta CT = CT(\text{Zielgen}) - CT(\text{Referenzgen})$$

Nun wird vom CT-Wert der zu untersuchenden Gene, was hier E-, N- oder VE-Cadherin der N-Cadherin defizienten Klone entspricht, der CT-Wert der Kontrollen, in diesem Fall E-, N- oder VE-Cadherin von SUM149PT oder der Kontrollzelllinien Scr2_2 und Scr2_6, abgezogen.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{KnockdownKlone}) - \Delta CT(\text{Kontrolle})$$

Der relative Expressionsunterschied ergibt sich dann aus: (Pfaffl, 2004)

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.2.4 Immunfluoreszenz

Um nicht nur die Konzentration, sondern auch die Lokalisation von E-, N- und VE-Cadherin bei den BT-20, den SUM149PT sowie den N-Cadherin defizienten Klonen zu beobachten, wurde bei allen Zelllinien eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf 4-kammrige Objektträger (Lab-Tek® Chamber Slide™) ausgesät, wobei pro Kammer 100.000 Zellen in 1 ml Kulturmedium eingesetzt wurden. Da jede Zelllinie mit je einem Primärantikörper gegen E- und N-Cadherin, sowie mit zwei Antikörpern gegen VE-Cadherin getestet werden sollte, wurden pro Zelllinie vier Kammern (=ein Objektträger) besät. Zusätzlich dazu wurde die gleiche Anzahl Zellen pro Zelllinie als Negativkontrolle ausgesät. Die Inkubation fand bei 37°C und 5% CO₂ statt, bis eine Konfluenz von 80–100% erreicht war.

Nachdem das alte Medium verworfen worden war, wurden die Kammern einmal kurz mit je 500 µl PBS-CaCl₂ ausgeschwenkt und dann dreimal für 5 min mit 200 µl PBS-CaCl₂ (siehe 3.1.4.2) zum Waschen auf den Schüttler gestellt. Um die Zellen zu fixieren wurden in jede Kammer 200 µl Paraformaldehyd gegeben und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Hernach wurde zweimal für 5 min mit 200 µl 4°C kaltem PBS-CaCl₂ gewaschen, bevor die Zellen 5 min mit 500 µl PBS-Triton pro Kammer (siehe 3.1.4.2) permeabilisiert wurden. Das Waschen erfolgte wieder zweimal für 5 min mit 200 µl PBS-CaCl₂. Anschließend wurden 200 µl Immunfluoreszenz(IF)-Block-Lösung (siehe 3.1.4.2) in jede Kammer pipettiert und für 15 min inkubiert.

Die Primärantikörper gegen E-, N- und VE-Cadherin wurden in der Antikörperverdünnungslösung (siehe 3.1.4.2 und Tabelle 5) aufgenommen und davon je 150 µl in eine Kammer gegeben. Um die unspezifische Bindung der Sekundärantikörper zu testen, wurden Negativkontrollen angesetzt, bei denen kein Primärantikörper zur Anwendung kam. Die Zellen zur Negativkontrolle verblieben in der IF-Block-Lösung. Die Inkubation fand auf einem Schüttler über Nacht in der Kühlzelle bei 4°C statt.

Nachdem die Zellen erst zweimal für 5 min mit je 200 µl PBS-Tween gewaschen und einmal 5 min mit je 200 µl PBS-Triton permeabilisiert worden waren, wurden die in Antikörperverdünnungslösung verdünnten Sekundärantikörper mit je 200 µl pro Kammer (siehe Tabelle 5) aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

Zielprotein	Primärantikörper	Verdünnung des Primärantikörpers in AK-Verd.-Lsg.	Sekundärantikörper	Verdünnung des Sekundärantikörpers in AK-Verd.Lsg
E-Cadherin	Monoclonal rabbit anti-E-cadherin (Novus Biologicals)	1:500	AlexaFluor® 594 chicken, anti-rabbit IgG (H&L) (invitrogen™)	1:1000
N-Cadherin	Purified Mouse Anti-N-Cadherin, (BD Transduction Laboratories™)	1:250	AlexaFluor® 594 chicken, anti-mouse IgG (H&L) (invitrogen™)	1:1000
VE-Cadherin	VE-cadherin (F-8) mouse monoclonal IgG (Santa Cruz)	1:500	AlexaFluor® 594 chicken, anti-mouse IgG (H&L) (invitrogen™)	1:1000
VE-Cadherin	Monoclonal goat VE-Cadherin (C-19) (Santa Cruz)	1:500	AlexaFluor® 594 rabbit, anti-goat IgG (H&L) (invitrogen™)	1:1500

Tabelle 5: verwendete Primär- und Sekundärantikörper bei der Immunfluoreszenzfärbung

der Zellen BT-20, SUM149PT, Sh-N-cad-3, Sh-N-cad-12, Scr2_2, Scr2_6. Abkürzungen: AK: Antikörper; Lsg.: Lösung; Verd.: Verdünnung.

Nach der Färbung mit dem Sekundärantikörper wurden erneut alle Kammern kurz mit 500 µl PBS-Tween ausgeschwenkt, dreimal 5 min mit 500 µl PBS-Tween gewaschen und einmal für 5 min mit 500 µl PBS-Triton permeabilisiert. Es wurde eine Kernfärbung mit je 500 µl Diamidinophenylindol(DAPI)-Lösung (Verdünnung 1:1000 in PBS) für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Ein abermaliges Waschen fand dreimal für 5 min mit PBS-Triton und darauf folgend zweimal für 5 min mit PBS statt. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgenommen, die Kammeraufsätze vom Objektträger gelöst und die trockenen Objektträger mit 200 µl Slow Fade® Gold antifade reagent eingedeckt, sowie mit einem Deckglas versehen. Unter dem AxioCam 2 imaging Mikroskop fand die Betrachtung der Bilder statt. Aufnahmen wurden mit der Kamera AxioCam MRc5 gemacht.

3.2.5 Untersuchung des Proliferationsverhaltens

Um den Einfluss von N-Cadherin auf die Proliferation zu untersuchen, wurde der im Folgenden erklärte Versuchsansatz mit der Zelllinie SUM149PT, den Knock-Down-Klonen

und Scramble-Kontrollen durchgeführt. Zusätzlich wurde die Zelllinie BT-20 mitgeführt, um das Proliferationsverhalten von SUM149PT und BT-20 zu vergleichen.

Die Zellen wurden trypsinisiert (siehe unter 3.2.1) und mit Hilfe der Neubauerzählkammer ausgezählt. In eine 12-Well-Platte wurden pro Well 50.000 Zellen der zu vergleichenden Zelllinien in 1 ml Kulturmedium mit 10% FKS ausgesät. Dabei wurden für jede Zelllinie zur Doppelbestimmung zwei Wells befüllt. Um die Zunahme der Zellzahl nach vier verschiedenen Zeitspannen zu ermitteln, wurden vier dieser 12-Well-Platten angelegt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Nach jeweils 24, 48, 72 und 96 h wurde eine der Platten aus dem Brutschrank genommen und das Medium verworfen. In jedes Well wurden 750 µl 100% Methanol und 1,5 µl (2 µg/ml) DAPI (entspricht einer Verdünnung von 1:500) pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h in Dunkelheit bei Raumtemperatur wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop von jedem Well je fünf Aufnahmen gemacht (Vergrößerung 40x) und die sichtbar gemachten Zellkerne hernach mit Hilfe der Software ImageJ ausgezählt.

Die mit dem Fluoreszenzmikroskop in einer Vergrößerung von 40x fotografierte Fläche beträgt 0,015556 cm²; die Fläche eines Wells in einer 12-Well-Platte (greiner) 3,9 cm².

$$\frac{3,9}{0,015556} = 250,707$$

Um die Gesamtzellzahl pro Well zu bestimmen, kann also der Mittelwert der ausgezählten Bilder mit 250,707 multipliziert werden. Die Zellzahl/cm² kann ermittelt werden, indem die Gesamtzellzahl pro Well durch 3,9 cm² dividiert wird.

$$\text{Gesamtzellzahl pro Well} = \text{Mittelwert der ausgezählten Bilder} \times 250,707$$

$$\text{Zellzahl/cm}^2 = \frac{\text{Gesamtzellzahl}}{3,9 \text{ cm}^2}$$

Zur Auswertung wurde im Programm Excel für jede Zelllinie die ermittelte Zellzahl/cm² über der Zeit aufgetragen, und an die Funktion eine exponentielle Trendlinie folgender Formel angelegt:

$$y = z \times e^{(\mu \times x)}$$

Die Berechnung der Verdopplungszeit t ergibt sich aus der Wachstumskonstante μ wie folgt:

$$t = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Die Verdopplungszeiten der Zelllinien wurden in einem vergleichenden Balkendiagramm zusammengefasst.

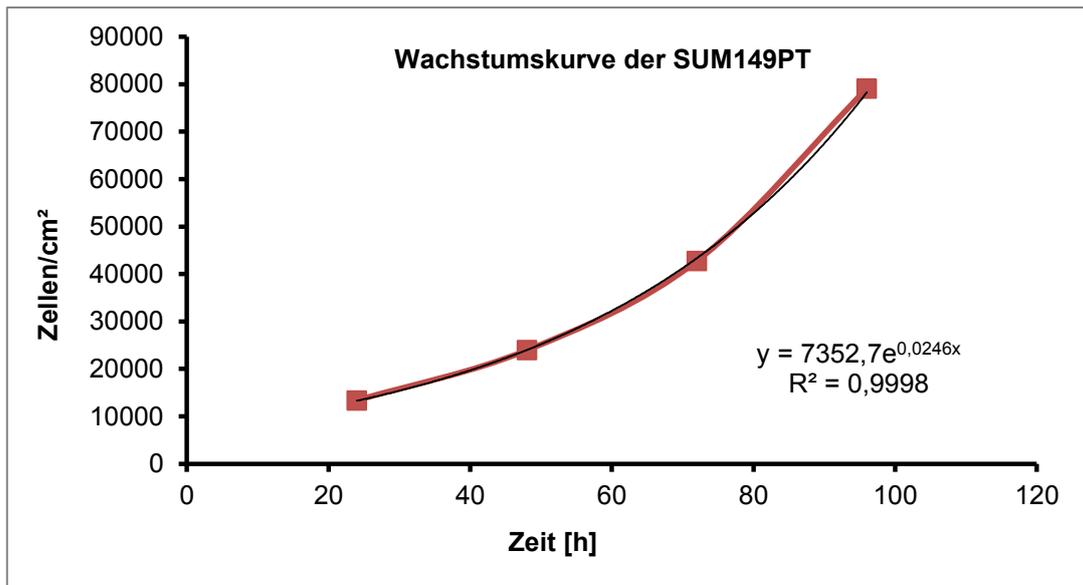


Abbildung 5: Beispiel einer Wachstumskurve zur Ermittlung der Verdopplungszeit

Dargestellt ist beispielhaft die Wachstumskurve der SUM149PT. Über der Zeit in h sind die Zellen/cm² aufgetragen. An die Wachstumskurve (rot) wurde eine exponentielle Trendlinie (schwarz) angelegt.

3.2.6 Sphäroidversuch

Ob N-Cadherin einen Einfluss auf das dreidimensionale Wachstum der Zellen hat, wurde mit dem im Folgenden erklärten Sphäroidversuch in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kunz-Schughart des Oncoray Dresden untersucht. Verwendet wurden die Zelllinien SUM149PT, Sh-N-cad-3, Sh-N-cad-12 und die Scramble-Kontrolle Scr2_2.

Um eine Adhärenz der Zellen an sie umgebenden Gefäß zu verhindern und eine Adhärenz der Zellen untereinander zu ermöglichen, wurden die für den Versuch verwendeten 96-Wellplatten konkav mit Agarose von Sigma-Aldrich beschichtet (Friedrich et al., 2009). 1% Agarose in DMEM-Medium wurde bei 120°C für 20 min und 2 bar autoklaviert. Von der noch warmen 1%-Agarose wurden unter der Sterilbank 50 µl in jedes Well einer 96-Wellplatte (flacher Boden) pipettiert. Hernach kühlten die Platten für 20 min bei Raumtemperatur aus, um ein Festwerden der Agarose zu gewährleisten. Die Zellen wurden trypsiniert (siehe 3.2.1), mit Hilfe des Casy ausgezählt und die benötigten Zellsuspensionsverdünnungen hergestellt. Pro Zelllinie wurde jeweils eine mit Agarose beschichtete 96-Wellplatte benötigt, in die in unterschiedlichen Verdünnungen die Zellen in 200 µl Zellkulturmedium pro Well ausgesät wurden. Es wurden in je 16 Wells 4000, 8000 bzw. 10.000 Zellen/Well pipettiert. Die Inkubation fand für 4 Tage und absoluter Ruhe bei 37°C und 5% CO₂ statt. Danach wurden die Zellsphäroide unter dem Mikroskop Axiovert 200 M betrachtet, mit der AxioCam MRm fotografiert und mit Hilfe der Software AxioVision 4.5 vermessen, sowie ein Mediumwechsel durchgeführt. Weitere Aufnahmen wurden an den Tagen 7, 9, 11 und 14 nach Aussaat der Zellen gemacht.

3.2.7 Untersuchung des Migrationsverhaltens mittels Boyden-Chamber

Um den Einfluss von N-Cadherin auf die Migration zu untersuchen, wurde der im Folgenden erklärte Versuchsansatz mit der Zelllinie SUM149PT, den N-Cadherin-Knock-Down-Klonen und Scramble-Kontrollen durchgeführt. Zusätzlich wurde die Zelllinie BT-20 mitgeführt, um das Migrationsverhalten von SUM149PT und BT-20 zu vergleichen.

Der hier vorgestellte Migrationsversuch basiert auf dem Prinzip der Boyden-Chamber (Chen, 2005). In eine 24-Wellplatte wurden pro zu untersuchende Zelllinie zwei FluoroBlok™ cell culture inserts (im Folgenden als Transwells bezeichnet) eingehängt. Durch die 8 µm großen Poren des Transwellbodens können die Zellen in die darunter liegenden Wells wandern. Antrieb für die Migration der Zellen ist die positive Chemotaxis eines FKS-Gradienten. Die Zellen wurden wie gewohnt trypsinisiert, zentrifugiert (siehe 3.2.1) und das Zellpellet in FKS-freiem Medium aufgenommen. Um die benötigte Konzentration der Zellsuspension herzustellen, wurden die Zellen in der Neubauerzählkammer gezählt. Pro Transwell wurden 50.000 Zellen in 450 µl FKS-freiem Medium ausgesät. In die benötigte Anzahl Wells der 24-Wellplatte wurden je 750 µl Medium mit 5% bzw. 20% FKS pipettiert und die befüllten Transwells anschließend in selbige eingehängt.

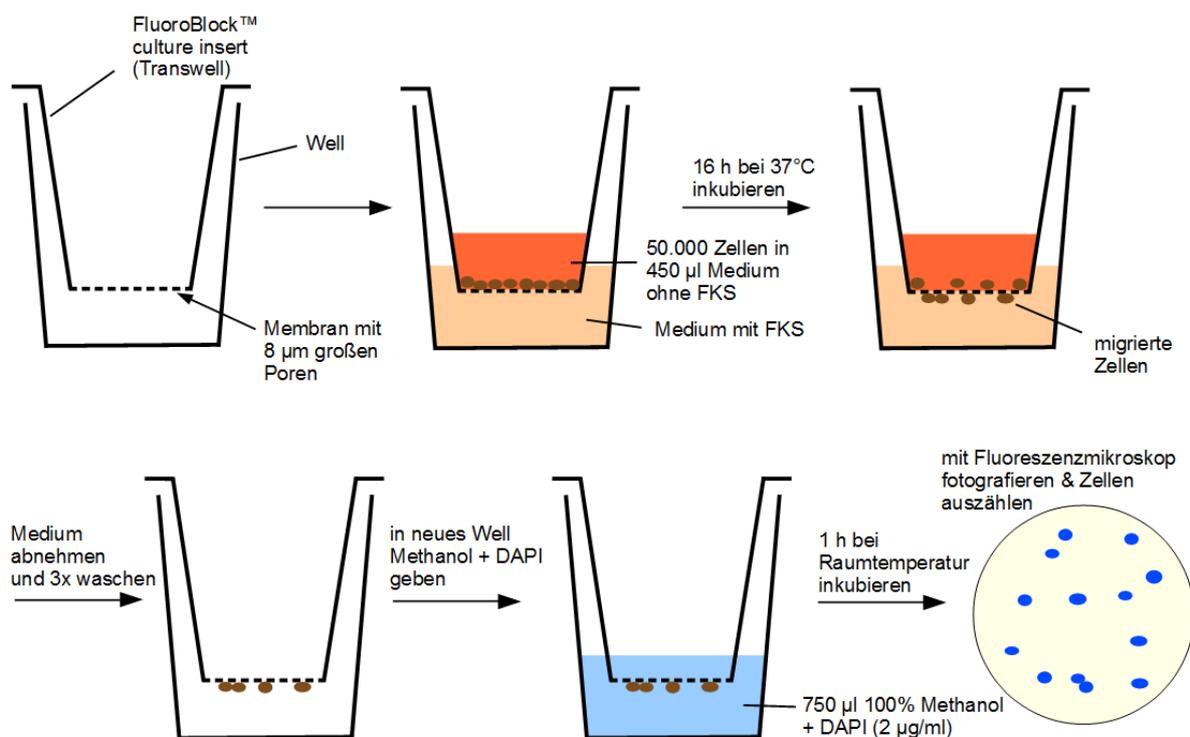


Abbildung 6: Schema des Migrationsversuches

Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden beide Medien verworfen und die Transwells dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Die gewaschenen Transwells wurden in neue Wells mit je 750 µl 100% Methanol und 1,5 µl (2 µg/ml) DAPI (entspricht einer Verdünnung von 1:500) platziert, um die Zellen zu fixieren und zu färben. Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert.

Mit einem Fluoreszenzmikroskop konnten anschließend die Zellkerne sichtbar gemacht werden. Es wurde von der Mitte jeder Transwellmembran von unten ein Foto in einer Vergrößerung von 40x und 100x gemacht. Mit Hilfe der Software ImageJ wurden die Zellkerne gezählt. Aus den je zwei erhaltenen Zellzahlen (Zweifachansatz) pro Zelllinie wurden Mittelwert und Mittelwertabweichung berechnet und in einem Balkendiagramm für alle Zelllinien im Vergleich aufgetragen.

3.2.8 Untersuchung des Migrationsverhaltens mittels *in vitro* Wundheilungsversuch

Der *in vitro* Wundheilungsversuch stellt eine weitere Möglichkeit dar, das Migrationsverhalten der Zelllinien zu untersuchen. Dieser Versuch veranschaulicht die Fähigkeit der Zellen einen Spalt zwischen zwei konfluenten Zellrasen zu überbrücken, was größtenteils auf Zellmigration, teilweise aber auch auf Proliferation zurückzuführen ist.

Die Zellen wurden wie gewohnt trypsinisiert, gezählt und in einer Konzentration von 700.000 Zellen/ml in Medium mit 10% FKS aufgenommen. In eine Petrischale mit zweikammrigem Einsatz (Ibidi 30µ-Dish 35mm high Culture-Insert) wurden von der Zellsuspension je 70 µl, was ca. 49.000 Zellen/Kammer entspricht, in die beiden Kammern pipettiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, während derer die Zellen sich zu einem konfluenten Zellrasen formierten, wurde der Einsatz aus der Petrischale entfernt, die Schale einmal mit 1 ml Medium gewaschen und mit 2 ml Medium (10% FKS) befüllt.

Die freie Fläche zwischen den beiden Zellrasen wurde unmittelbar nach Entnahme des Einsatzes unter einem Phasenkontrastmikroskop (Vergrößerung 40x) als Zeitpunkt 0 fotografiert, woraufhin die Schalen weiter bei 37°C inkubiert wurden. Nach je 12, 15, 18, 21 und 24 h erfolgten an gleicher Stelle wie zu Zeitpunkt 0 weitere Aufnahmen der zuwachsenden Fläche. Die Bestimmung der freien Fläche auf den erhaltenen Aufnahmen fand mit Hilfe des Programms ImageJ statt, die weitere Auswertung mit Excel. Indem die bestimmten freien Flächen von der jeweiligen Fläche zum Zeitpunkt 0 subtrahiert wurden, erhielt man die von den Zellen neu bedeckte Fläche. Die Werte der bedeckten Fläche wurden in einem Diagramm über der Zeit aufgetragen.

Der Anstieg einer eingefügten Trendlinie im linearen Bereich entspricht hierbei der surface coverage rate (SCR) in $\mu\text{m}^2/\text{h}$, also der Geschwindigkeit, mit der die aufeinander zuwandernden Zellen eine Fläche bedecken.

Die vergleichende Darstellung der SCRs der verschiedenen Zelllinien erfolgte in einem Balkendiagramm.

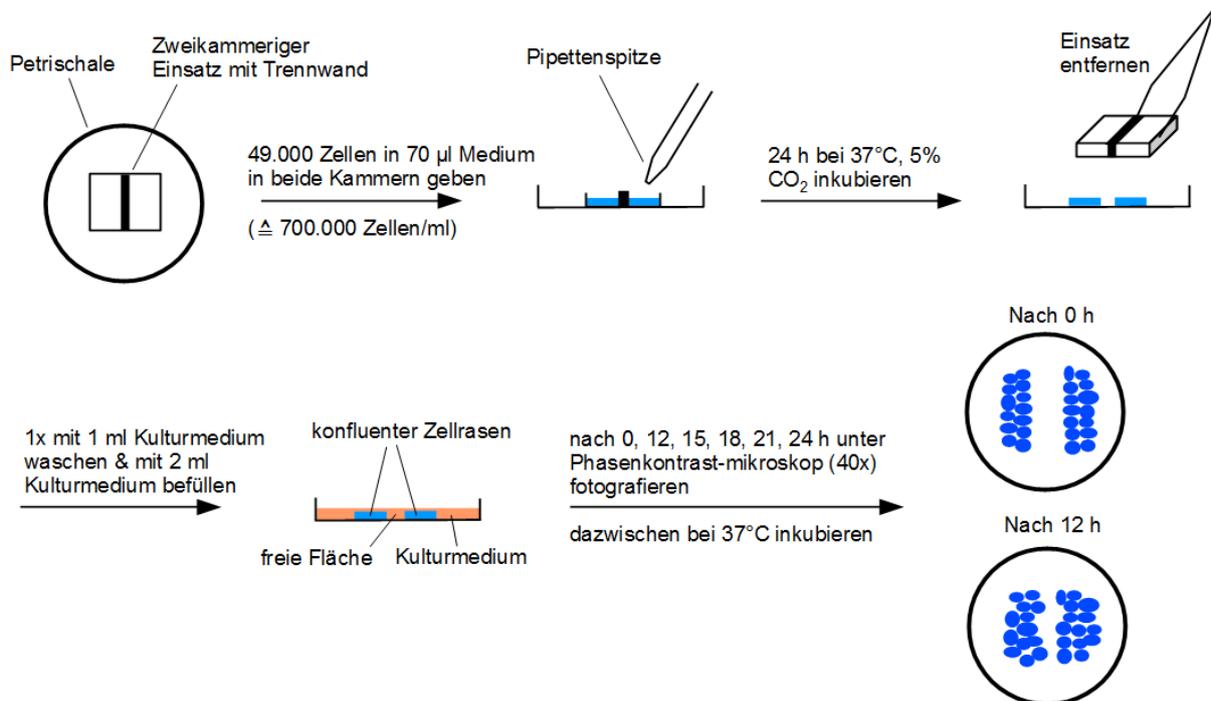


Abbildung 7: Schema des *in vitro* Wundheilungsversuches

3.2.9 Untersuchung des Invasionsverhaltens

Um den Einfluss von N-Cadherin auf die Invasion zu untersuchen, wurde der im Folgenden erklärte Versuchsansatz mit der Zelllinie SUM149PT und den N-Cadherin-Knock-Down-Klonen und der Scramble-Kontrolle 2_2 durchgeführt. Zusätzlich wurde die Zelllinie BT-20 mitgeführt, um das Invasionsverhalten von SUM149PT und BT-20 zu vergleichen.

Der Versuchsaufbau zur Untersuchung der Invasion ist ganz ähnlich dem der Migration (siehe 3.2.7). In eine 24-Wellplatte wurden pro zu untersuchende Zelllinie zwei Transwells eingehängt, die mit Matrigel beschichtet wurden, das die extrazelluläre Matrix simulieren sollte. Als Antrieb diente auch hier ein FKS-Gradient.

Es wurde eine Verdünnung von 0,25 mg/ml BD Matrigel™ Matrix Basement Membrane (Stock 8,4 mg/ml) in PBS hergestellt und davon je 100 μl in die Transwells gegeben. Um ein

Trocknen des Matrigels zu erreichen, wurde die Platte 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend für mindestens 16 h unter die Sterilbank gestellt. Etwa 1 h vor Aussaat der Zellen in die Transwells wurden in ein jedes 200 µl serumfreies Medium pipettiert, um das Matrigel zu rehydrieren.

Die Zellen wurden wie gewöhnlich trypsinisiert, gezählt und in serumfreiem Medium in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml aufgenommen. In jedes Transwell wurden 50.000 Zellen in 250 µl serumfreiem Medium gegeben und die Transwells anschließend in Wells mit 750 µl Medium mit 20% FKS eingehängt. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37°C und 5% CO₂. Hernach wurde das Medium aus den Transwells und Wells verworfen und alle Transwells, wie bei der Migration geschildert (siehe 3.2.7), mit PBS gewaschen und die Zellen mit Methanol und DAPI fixiert und gefärbt.

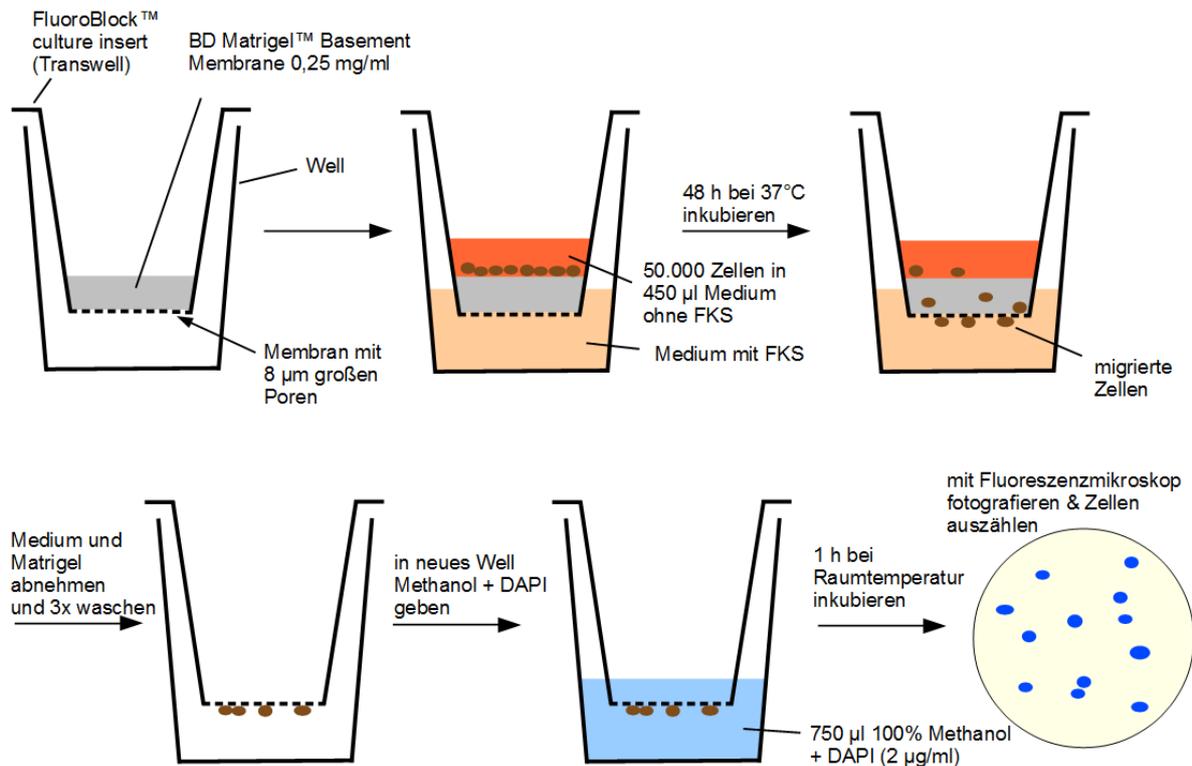


Abbildung 8: Schema des Invasionsversuches

Nach einer Färbezeit von 1 h bei Raumtemperatur und in Dunkelheit wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop von jedem Invasionstranswell fünf Aufnahmen (mittig, oben, unten, links, rechts) gemacht. Im Gegensatz zur Migration waren die Zellen bei den Invasionsversuchen häufig ungleichmäßig über das gesamte Transwell verteilt, so dass die Aufnahme von fünf Bildern erforderlich war, um repräsentative Werte zu erhalten. Vermutlich

ist die größere lokale Varianz der Anzahl der invasiven Zellen auf eine trotz sorgfältiger Arbeit nicht ganz unvermeidbare ungleichmäßige Verteilung des Matrigels zurückzuführen; sowie darauf, dass für die nachfolgenden Zellen die Invasion an einer Stelle erleichtert ist, an der zuvor schon andere Zellen das Gel durchwandert haben. Die ungleichmäßige Verteilung der invasiven Zellen könnte aber auch durch das Phänomen der kollektiven Invasion zustande kommen. Je nach Dichte der extrazellulären Matrix scheinen Zellen einen Einzelzell- oder Kollektivinvasionsmodus aufzuweisen (Haeger et al., 2014).

Mit Hilfe der Software ImageJ wurden die Zellkerne gezählt. Aus den je zehn erhaltenen Zellzahlen pro Zelllinie (je fünf Bilder von je zwei Transwells) wurden Mittelwert, Mittelwertabweichung und Standardabweichung berechnet. Das arithmetische Mittel aller unabhängig voneinander durchgeführten Versuche wurde in einem vergleichenden Balkendiagramm aufgetragen.

3.2.10 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen aller Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Office Excel 2010 erstellt.

3.2.10.1 Das arithmetische Mittel

Das arithmetische Mittel \bar{x} repräsentiert bei einer normalverteilten Grundgesamtheit den Schwerpunkt der Verteilung. Dabei werden die Einzelwerte (x) summiert und durch die Zahl der Bestimmung (n) dividiert. (Sachs, 1974)

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

3.2.10.2 Die Standardabweichung

Die Standardabweichung s dient der Beurteilung der Streuung von Einzelwerten um das arithmetische Mittel, unabhängig von der Normalverteilung. Sie entspricht der Quadratwurzel aus der Summe der Quadrate der Abweichungen der Einzelwerte (x) vom arithmetischen Mittel (\bar{x}), dividiert durch die Anzahl der Einzelwerte minus 1 und berechnet sich somit nach folgender Formel (Hedderich & Sachs, 2012):

$$s = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x} - x)^2}{n - 1}}$$

In den Diagrammen werden die Standardabweichungen in den Fehlerbalken sichtbar.

3.2.10.3 Student-t-Test

Der t-Test ist die einfachste Methode zur Prüfung von signifikanten Unterschieden quantitativer Art zwischen zwei normalverteilten Kollektiven. Es wurde ein zweiseitiger t-Test angewandt. Da angenommen wurde, dass die beiden Stichproben nicht unbedingt gleicher Varianz sein müssen, wurde bei Microsoft Office Excel der Typ3 (heteroskedastisch) gewählt. Die Signifikanz der Differenz zwischen den beiden Stichproben wird im Wahrscheinlichkeitsgrad p angegeben. In dieser Arbeit wurden die Signifikanzen wie folgt festgelegt:

*p ≤ 0,05 als signifikant

**p ≤ 0,01 als hochsignifikant

***p ≤ 0,001 als höchstsignifikant

4 Ergebnisse

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass N- und VE-Cadherin defiziente Tumore im Vergleich zu N- und VE-Cadherin exprimierenden Kontrollzellen ein signifikant verringertes Wachstum haben, und dass N-Cadherin die Expression von VE-Cadherin beeinflusst (Rezaei et al., 2012). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass eine Überexpression von N-Cadherin bei humanen epithelialen Tumorzellen zu erhöhter Migration und Invasion führt (Hazan et al., 2000; Nagi et al., 2005). In der humanen Brustkrebszelllinie SUM149PT führt eine Herabregulierung von VE-Cadherin zu einer signifikanten Reduzierung des Migrations- und Invasionsverhaltens (Schmidt, 2014).

Die Auswirkungen der Herabregulierung von N-Cadherin auf die Expression und Lokalisation anderer Cadherine und Auswirkungen auf die Tumorprogression in humanen Brustkrebszellen sollen hier *in vitro* untersucht werden.

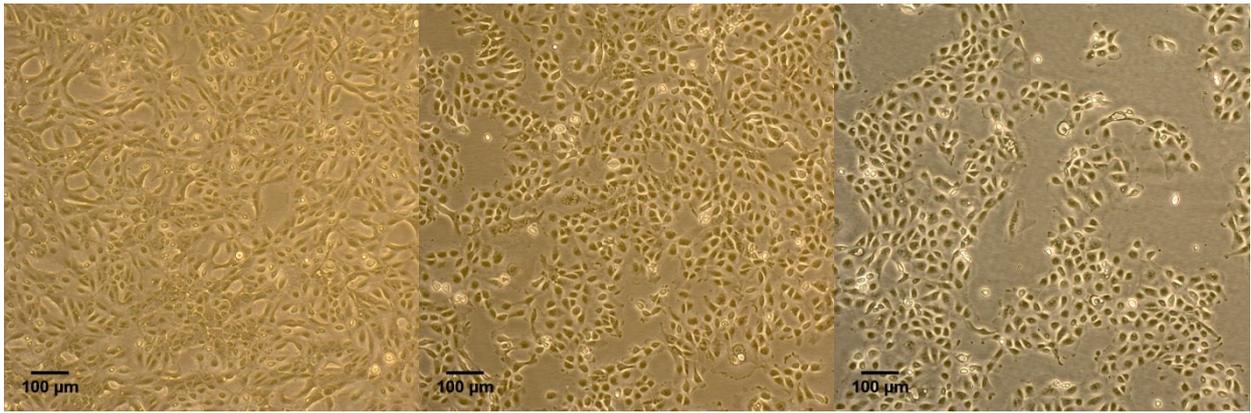
4.1 Charakterisierung der N-Cadherin defizienten Klone

In dieser Arbeit wurden die mit shRNA stabil transduzierten N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3 und Sh-N-cad-12 mit der humanen Brustkrebszelllinie SUM149PT und den Scramble-Kontrollen Scr2_2 und Scr2_6 verglichen.

Die stabile Herabregulierung des N-Cadherin basiert auf der Transduktion von shRNA, die spezifisch gegen humane N-Cadherin-mRNA gerichtet ist, mit Hilfe eines lentiviralen Vektors in die SUM149PT. Um sicherzustellen, dass das zu untersuchende Verhalten der Klone auf die Herabregulierung von N-Cadherin, und nicht auf durch den Prozess der Transduktion ausgelöste Ursachen zurückzuführen ist, wurden Kontrollklone hergestellt. In die Kontrollklone wurde eine scramble-RNA eingebracht, die keine signifikanten Homologien mit dem humanen Genom aufweist. Alle Zelllinien wurden von A. Klawitter und Dr. rer. medic. M. Grosser (Institut für Pathologie, Dresden; Bereich Forschung) hergestellt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Außerdem wurde in einigen Versuchen die Zelllinie BT-20 mitgeführt und ein Vergleich mit den SUM149PT durchgeführt. Dazu war eine morphologische sowie molekulare Charakterisierung erforderlich.

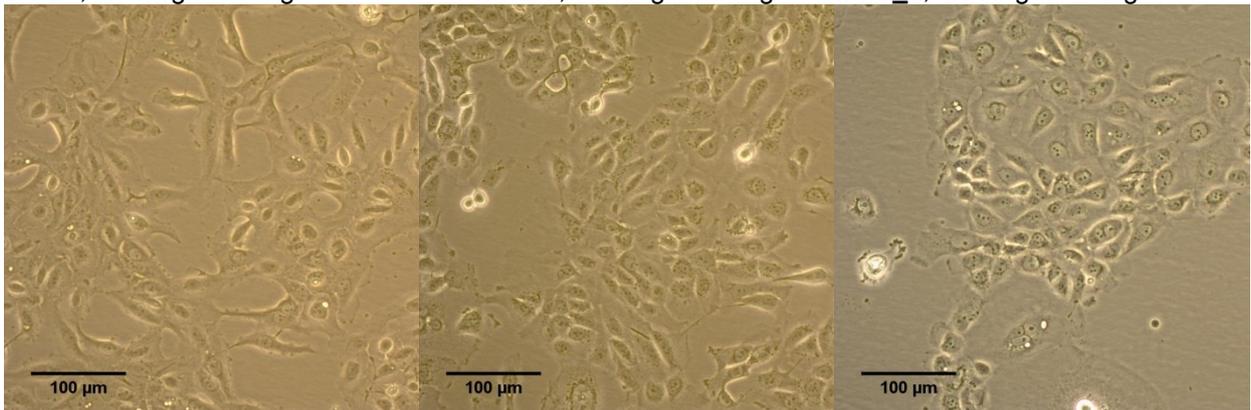
Morphologisch zeigen alle Zelllinien einen für Epithelzellen charakteristischen an der Zellkulturflasche adhärenen Phänotyp mit einer geschlossenen Fläche aus einer einzigen Lage rundlicher, glattrandiger, pflastersteinartig angeordneter Zellen (siehe Abbildung 9). Vereinzelt weisen die Zellen aller Zelllinien jedoch eher eine für Mesenchymzellen typische längliche Form auf und sind nicht in den Zellkolonien integriert. Besonders stark fällt dies bei der Zelllinie BT-20 auf. Daraus ließe sich schließen, dass alle verwendeten Zelllinien, vor allem aber die Zelllinie BT-20, teilweise schon dem Prozess der EMT unterliegen.



BT-20, 4x Vergrößerung

SUM149PT, 4x Vergrößerung

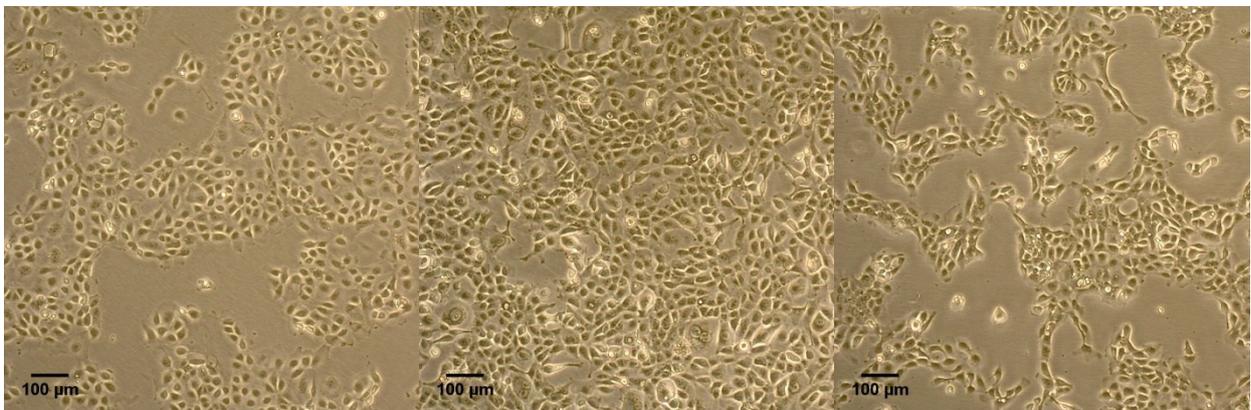
Scr2_2, 4x Vergrößerung



BT-20, 10x Vergrößerung

SUM149PT, 10x Vergrößerung

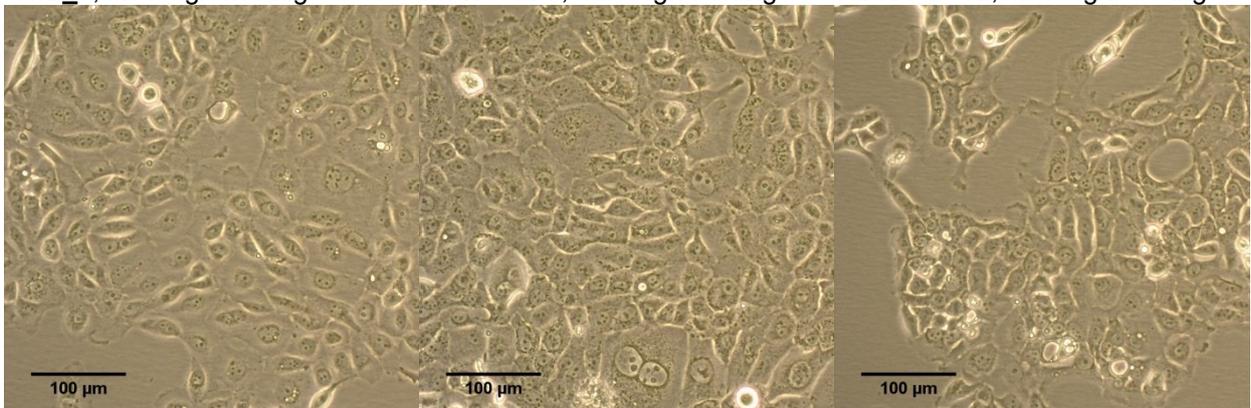
Scr2_2, 10x Vergrößerung



Scr2_6, 4x Vergrößerung

Sh-N-cad-3, 4x Vergrößerung

Sh-N-cad-12, 4x Vergrößerung



Scr2_6, 10x Vergrößerung

Sh-N-cad-3, 10x Vergrößerung

Sh-N-cad-12, 10x Vergrößerung

Abbildung 9: Morphologie der verwendeten Zelllinien

Phasenkontrastfotographien der Zelllinien BT-20, SUM149PT, Scr2_2, Scr2_6, Sh-N-cad-3 und Sh-N-cad-12 je in 4x und 10x Objektivvergrößerung

4.1.1 Untersuchung der E-, N- und VE-Cadherin-Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und q-PCR

Um die mRNA-Expression von E-, N- und VE-Cadherin zu bestimmen, wurden eine RT-PCR sowie eine q-PCR, wie unter 3.2.3 erläutert, durchgeführt. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der RT-PCR zusammengestellt.

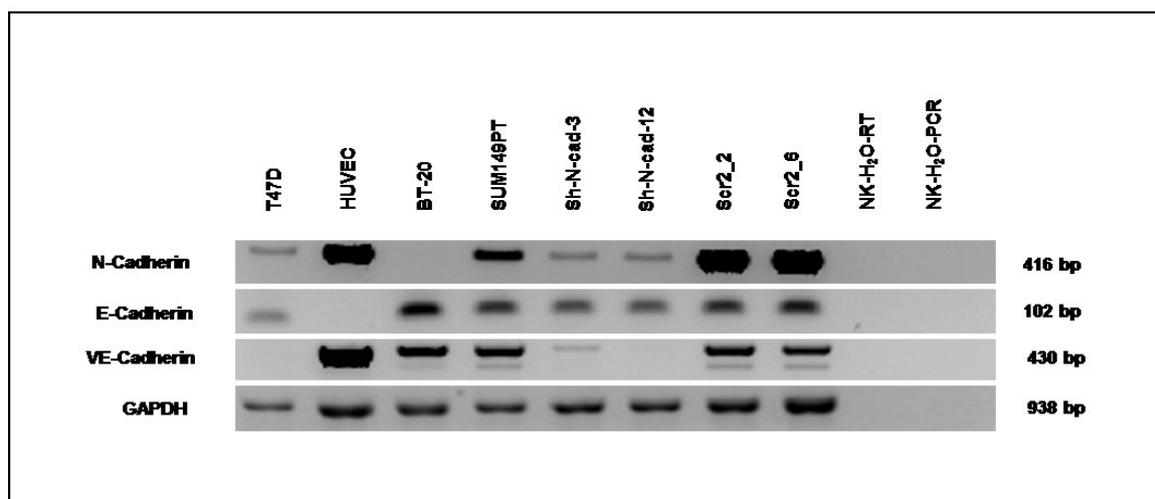


Abbildung 10: Ergebnisse der RT-PCR

Die Zelllinie BT-20 besitzt im Gegensatz zu den SUM149PT kein N-Cadherin. Die N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 zeigen im Vergleich zu den SUM149PT/Scramble-Kontrollen eine deutlich verringerte Expression von N-Cadherin. Die E-Cadherin-Expression scheint bei allen untersuchten Zelllinien etwa gleich stark ausgeprägt. Die BT-20 besitzen VE-Cadherin. Verglichen mit den SUM149PT/Scramble zeigen Sh-N-cad3/Sh-N-cad-12 kaum bis keine Expression von VE-Cadherin. Als Positivkontrolle für N-/VE-Cadherin wurden HUVEC-Endothelzellen verwendet, für E-Cadherin die Epithelzelllinie T47D. Als Haushaltsgen diente *GAPDH*. (NK: Negativkontrolle)

Die Zelllinie BT-20 zeigt keine Expression von N-Cadherin, während die SUM149PT N-Cadherin exprimieren. Im Vergleich zu den SUM149PT und den Scramble-Kontrollen zeigen die N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3 und Sh-N-cad-12 eine deutlich verringerte N-Cadherin-Expression. Die Scramble-Kontrollen scheinen im Vergleich zu den SUM149PT eine etwas höhere Konzentration an N-Cadherin-mRNA zu besitzen. Hierbei ist jedoch auch zu beachten, dass die Banden des Haushaltsgens *GAPDH*, die bei allen Proben gleich intensiv sein sollten, bei Scr2_2 und vor allem Scr2_6 etwas stärker ausgeprägt sind als bei den SUM149PT, also vermutlich bei den Scramble eine geringfügig höhere Proteinmenge eingesetzt wurde als bei den SUM149PT und den N-Cadherin defizienten Klonen. Als Positivkontrolle für die Expression von N-Cadherin kamen HUVEC-Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene zum Einsatz.

Die E-Cadherin-Expression weist sowohl im Vergleich zwischen BT-20 und SUM149PT als auch zwischen den N-Cadherin defizienten Klonen und den SUM149PT und Scramble keine deutlich erkennbaren Unterschiede auf. Als Positivkontrolle wurde die epitheliale Zelllinie T47D verwendet.

Sowohl die BT-20 auch als die SUM149PT exprimieren aberrant VE-Cadherin, wobei kein deutlicher Konzentrationsunterschied auf mRNA-Ebene feststellbar ist. Die N-Cadherin defizienten Klone zeigen im Vergleich zu den SUM149PT und den Scramble-Kontrollen überraschenderweise eine stark verringerte Konzentration an VE-Cadherin. Während bei den Sh-N-cad-3 noch eine leichte VE-Cadherin-Bande sichtbar ist, zeigt Sh-N-cad-12 keine Bande mehr und somit keine in der RT-PCR nachweisbare VE-Cadherin-Expression.

Um die Ergebnisse der RT-PCR zu überprüfen, wurde zusätzlich eine q-PCR mit relativer Quantifizierung mittels $\Delta\Delta$ -CT-Methode durchgeführt. Als Referenzgen wurde PPIA verwendet und der relative Expressionsunterschied der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 zu den SUM149PT bzw. den Scramble-Kontrollen Scr2_2/Scr2_6 bestimmt. Als relevante Herabregulierung wird hier ein relativer Expressionsunterschied unter 0,5 betrachtet. Hierbei bestätigen sich die Ergebnisse der RT-PCR.

Die N-Cadherin-Expression ist bei den N-Cadherin defizienten Klonen im Vergleich zu den SUM149PT und den Scramble stark reduziert, wobei der Klon Sh-N-cad-12 stärker herunterreguliert ist als Sh-N-cad-3. Die Scramble-Kontrollen Scr2_2 und Scr2_6 besitzen beide etwas mehr N-Cadherin als die SUM149PT, da die N-Cadherin defizienten Klone im Vergleich zu den Scramble-Kontrollen eine stärkere Herabregulierung aufweisen, als im Vergleich zu den SUM149PT.

Bei der E-Cadherin-Expression zeigt sich, wie schon bei der RT-PCR, kein relevanter Expressionsunterschied der N-Cadherin defizienten Klone bezogen auf die SUM149PT und die Scramble-Kontrollen.

Bei der Untersuchung der VE-Cadherin-Expression zeigten sich für den N-Cadherin defizienten Klon Sh-N-cad-3 die CT-Werte bei 34,06 und 34,37; beim N-Cadherin defizienten Klon Sh-N-cad-12 lagen die CT-Werte bei 36,62 und 37,02. Bei 45 PCR-Zyklen kann ab einem CT-Wert von 35 davon ausgegangen werden, dass die Molekülzahl des zu bestimmenden Gens so gering ist, dass mit dieser Methode keine Expression desselbigen nachweisbar ist. Der Klon Sh-N-cad-12 besitzt also keine mit dieser Methode nachweisbare Expression von VE-Cadherin. Es zeigt sich wie schon in der RT-PCR, dass die N-Cadherin defizienten Klone im Vergleich zu den SUM149PT und den Scramble auch stark für VE-Cadherin herunterreguliert sind, wobei der Klon Sh-N-cad-12 sowohl stärker für N- als auch für VE-Cadherin herunterreguliert ist als Sh-N-cad-3.

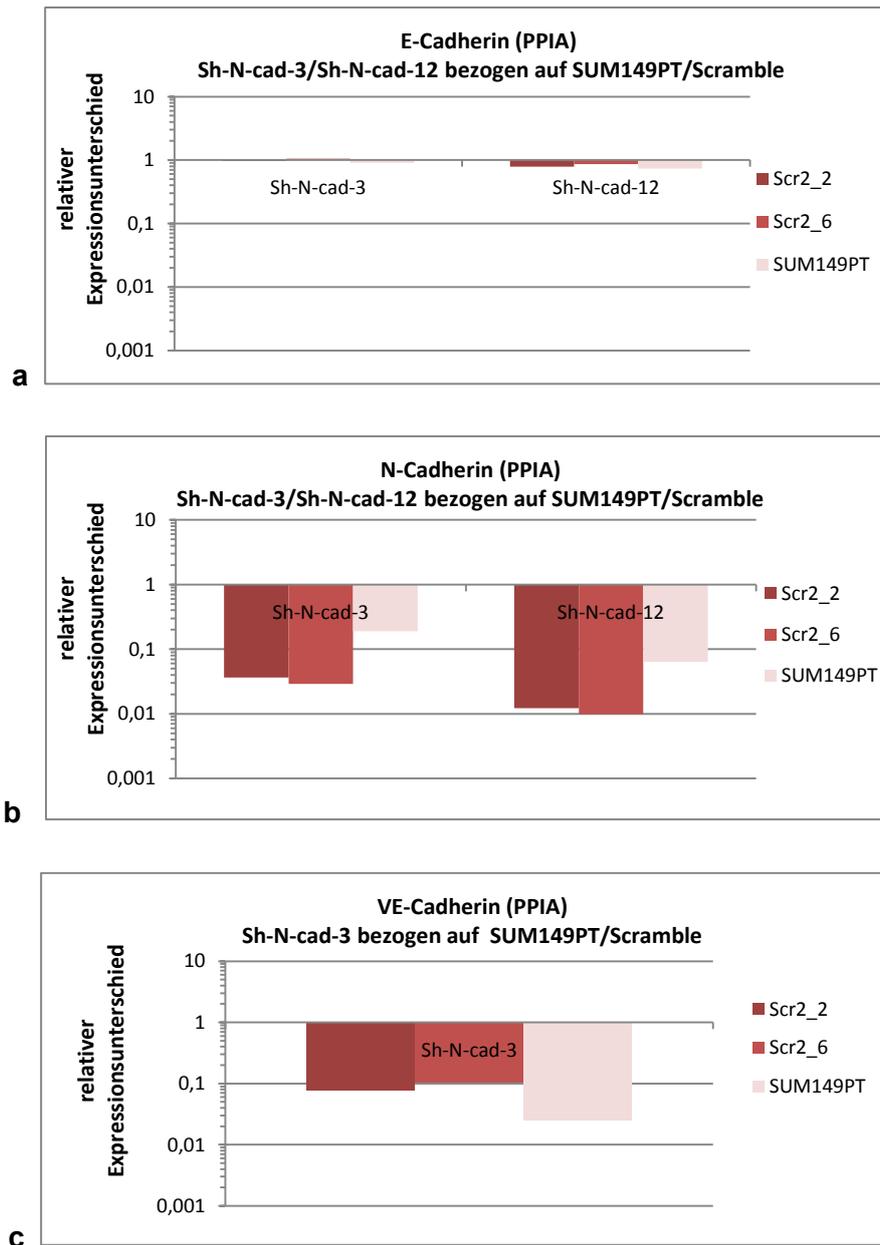


Abbildung 11: Ergebnisse der q-PCR

Dargestellt ist der relative Expressionsunterschied von E-Cadherin (a), N-Cadherin (b) und VE-Cadherin (c) der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 bezogen auf die SUM149PT und die Scramble Scr2_2/Scr2_6. Als Referenzgen wurde PPIA verwendet. Als relevante Herabregulierung wird hier ein relativer Expressionsunterschied von 0,5 gewertet.

- Die E-Cadherin-Expression der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3 und SH-N-cad-12 weist keinen relevanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen auf.
- Die N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3 und Sh-N-cad-12 sind im Vergleich zu SUM149PT/Scr2_2/Scr2_6 stark für N-Cadherin herabreguliert. Der Klon Sh-N-cad-12 zeigt eine noch höhere Herabregulierung als Sh-N-cad-3. Die Scramble 2_2/2_6 weisen beide etwas mehr N-Cadherin auf, als die SUM149PT, da Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 im Vergleich zu den Scramble stärker herabreguliert sind als im Vergleich zu den SUM149PT.
- Der N-Cadherin defiziente Klon Sh-N-cad-3 zeigt im Vergleich zu den SUM149PT und den Scramble Scr2_2/Scr2_6 eine stark herabregulierte Expression von VE-Cadherin. Der Klon Sh-N-cad-12 zeigt bei 45 PCR-Zyklen die CT-Werte erst bei 36,62 und 37,02. Ab einem CT-Wert von 35 kann davon ausgegangen werden, dass die Molekülzahl so gering ist, dass mit dieser Methode keine Expression von VE-Cadherin mehr nachgewiesen werden kann.

4.1.2 Untersuchung der E-, N- und VE-Cadherin-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot

Um die Cadherinexpression auch auf Proteinebene zu vergleichen, wurde ein Western Blot durchgeführt, dessen Ergebnisse in Abbildung 12 dargestellt sind. Wie erwartet findet sich bei der Zelllinie BT-20 keine Bande für N-Cadherin, während die SUM149PT eine Expression zeigen. Im Vergleich zu den SUM149PT und den Scramble-Kontrollen Scr2_2 und Scr2_6 zeigen die Klone Sh-N-cad-3 und Sh-N-cad-12 auch hier eine deutlich geringere Expression von N-Cadherin. Als Kontrollzelllinie für den Nachweis der N-Cadherin-Expression wurde die Endothelzelllinie HUVEC eingesetzt. Bei der Expression von E-Cadherin zeigt sich auch im Western Blot weder ein deutlicher Unterschied zwischen BT-20 und SUM149PT, noch zwischen den N-Cadherin defizienten Klonen und den SUM149PT und Scramble-Kontrollen. Als Positivkontrolle kam die Epithelzelllinie T47D zum Einsatz, die eine höhere Konzentration an E-Cadherin aufweist als die untersuchten Zelllinien. Die aberrante VE-Cadherin-Expression auf Proteinebene scheint bei den BT-20 höher zu sein als bei den SUM149PT. Auch hier zeigen die N-Cadherin defizienten Klone im Western Blot keine Banden und somit keine Expression von VE-Cadherin. Als Positivkontrolle wurde Protein von HUVEC-Zellen verwendet.

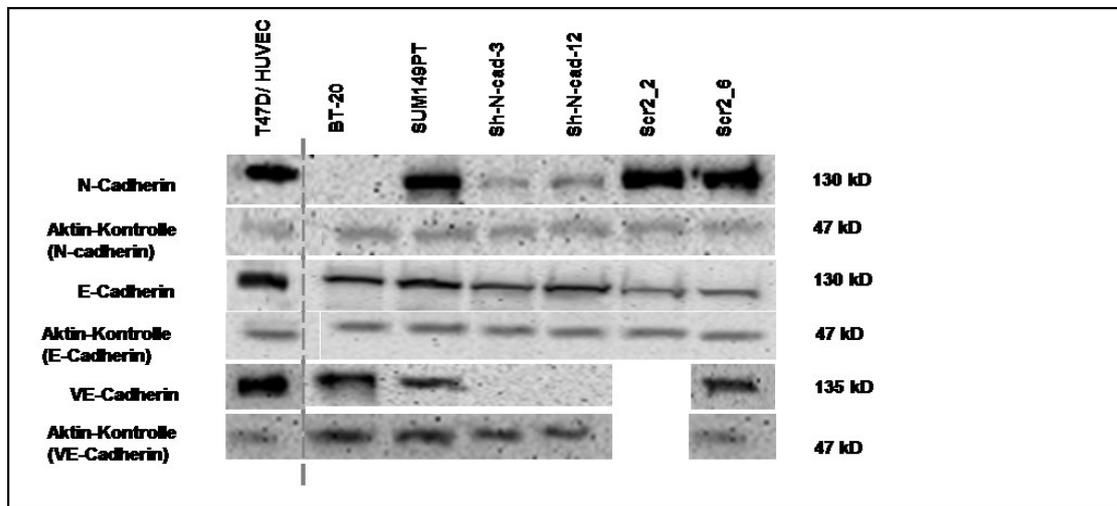


Abbildung 12: Ergebnisse des Western Blots.

Die Zelllinie BT-20 besitzt auch auf Proteinebene im Gegensatz zu den SUM149PT kein N-Cadherin. Die N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 zeigen im Vergleich zu den SUM149PT/Scramble-Kontrollen eine deutlich verringerte Expression von N-Cadherin. Die E-Cadherin-Expression ist bei allen untersuchten Zelllinien etwa gleich stark ausgeprägt. Die BT-20 scheinen im Vergleich zu den SUM149PT etwas mehr VE-Cadherin zu besitzen. Verglichen mit den SUM149PT/Scr2_6 zeigen Sh-N-cad3/Sh-N-cad-12 hier keine Expression von VE-Cadherin. Die Zelllinie Scr2_2 wurde bei diesem Western Blot zur Untersuchung der VE-Cadherin-Expression nicht mitgeführt, wies aber in vorherigen Versuchen eine ähnlich intensive Bande wie die Scr2_6 auf. Als Positivkontrolle für N-/VE-Cadherin wurden HUVEC-Endothelzellen verwendet, für E-Cadherin die Epithelzelllinie T47D. Als Haushaltsgen diente β -Aktin.

4.1.3 Untersuchung der E-, N- und VE-Cadherin-Expression und -Lokalisation mittels Immunfluoreszenzfärbung

Um neben der rein quantitativen Expressionsanalyse der obigen Methoden zusätzlich Informationen über die Lokalisation der Cadherine in den Zellen zu gewinnen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen aller Zelllinien für E-, N- und VE-Cadherin, wie unter 3.2.4 erklärt, durchgeführt. Dabei wurden die Zellen stets mit einem spezifischen Primärantikörper gegen E-, N- oder VE-Cadherin, dann mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper gefärbt und schließlich wurde eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt. Beim Fotografieren der Färbungen wurde erst eine Aufnahme der cadherinspezifischen Färbung (rot) gemacht, und dann an derselben Stelle eine weitere Aufnahme der DAPI-Kernfärbung (blau). Die beiden Bilder wurden im „Merge“ übereinander gelegt. Um die unspezifische Bindung der fluoreszierenden Sekundärantikörper zu testen, wurden Negativkontrollen angesetzt, bei denen kein Primärantikörper zum Einsatz kam.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 und Abbildung 14 zusammengestellt. Dabei zeigt sich wie erwartet bei Einsatz eines Primärantikörpers gegen N-Cadherin, dass die Zelllinie BT-20 kein N-Cadherin besitzt, während die SUM149PT eine N-Cadherin-Expression in der Zellmembran zeigen (siehe Abbildung 13a). Die N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 zeigen im Gegensatz zu den Kontrollen SUM149PT und den Scramble keine deutliche Expression von N-Cadherin (siehe Abbildung 14a). Bei der Färbung unter Einsatz eines Primärantikörpers gegen E-Cadherin zeigt sich bei allen verwendeten Zelllinien eine deutliche Expression von E-Cadherin in der Zellmembran (siehe Abbildung 13b, 14b). Ein Unterschied in der Quantität oder Lokalisation des E-Cadherin zwischen den N-Cadherin defizienten Klonen und den Kontrollen ist nicht festzustellen (siehe Abbildung 14b). Bei der Färbung des VE-Cadherin wurden verschiedene Primärantikörper gegen VE-Cadherin getestet. Aufgrund der teilweise sehr unspezifischen Bindung des Primärantikörpers c-19 (Santa Cruz Biotechnology) (siehe Negativkontrolle in Abbildung 13b), kam für weitere Versuche der VE-Antikörper f-8 (Santa Cruz Biotechnology) zum Einsatz. Im Vergleich zu den SUM149PT zeigen die BT-20 eine etwas deutlichere Expression von VE-Cadherin in der Zellmembran (siehe Abbildung 13c). Bei den N-Cadherin defizienten Klonen Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 ist im Gegensatz zu den Kontrollen Sum149PT/Scramble, bei denen das VE-Cadherin in der Zellmembran deutlich zu erkennen ist, kein VE-Cadherin zu sehen (siehe Abbildung 14c).

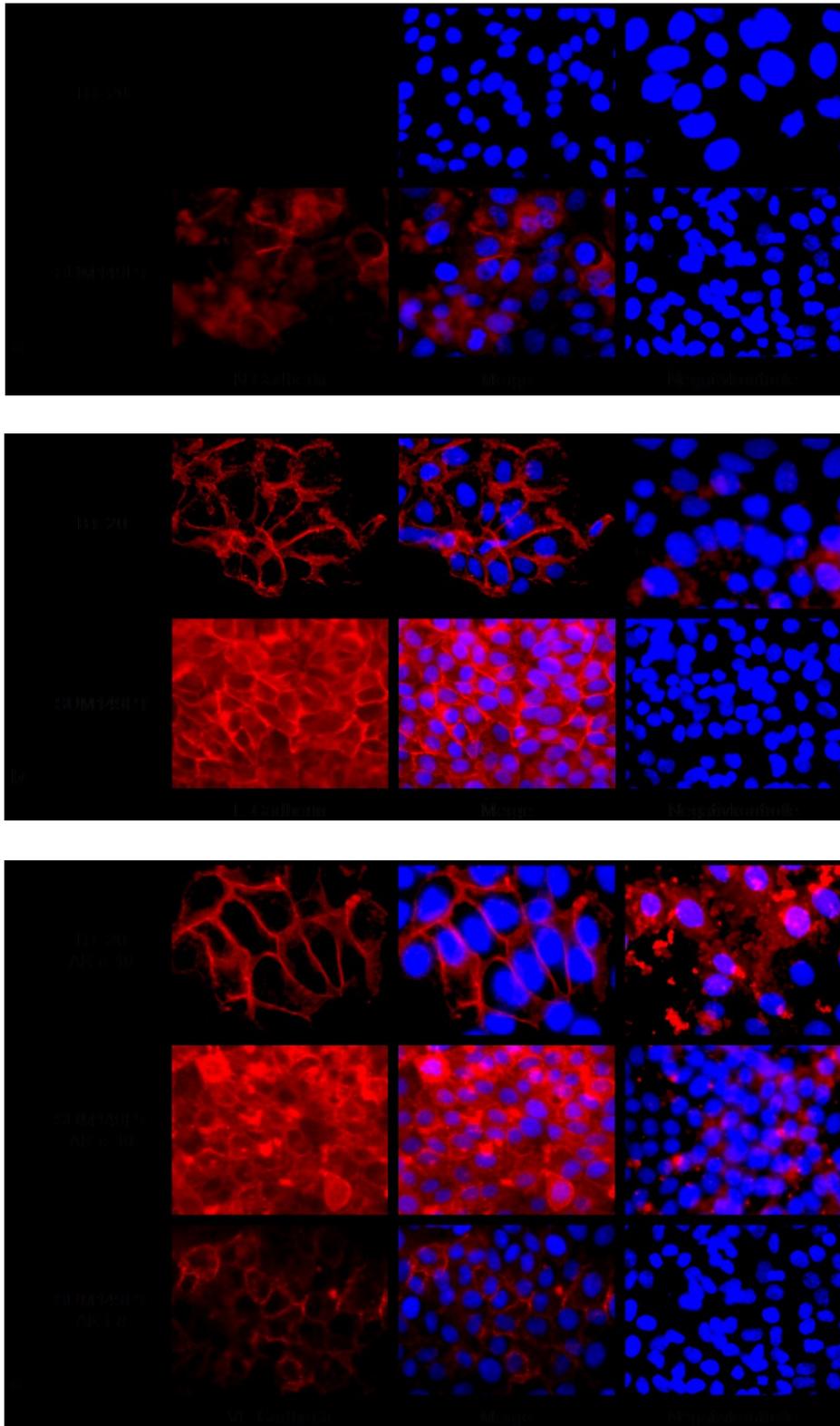
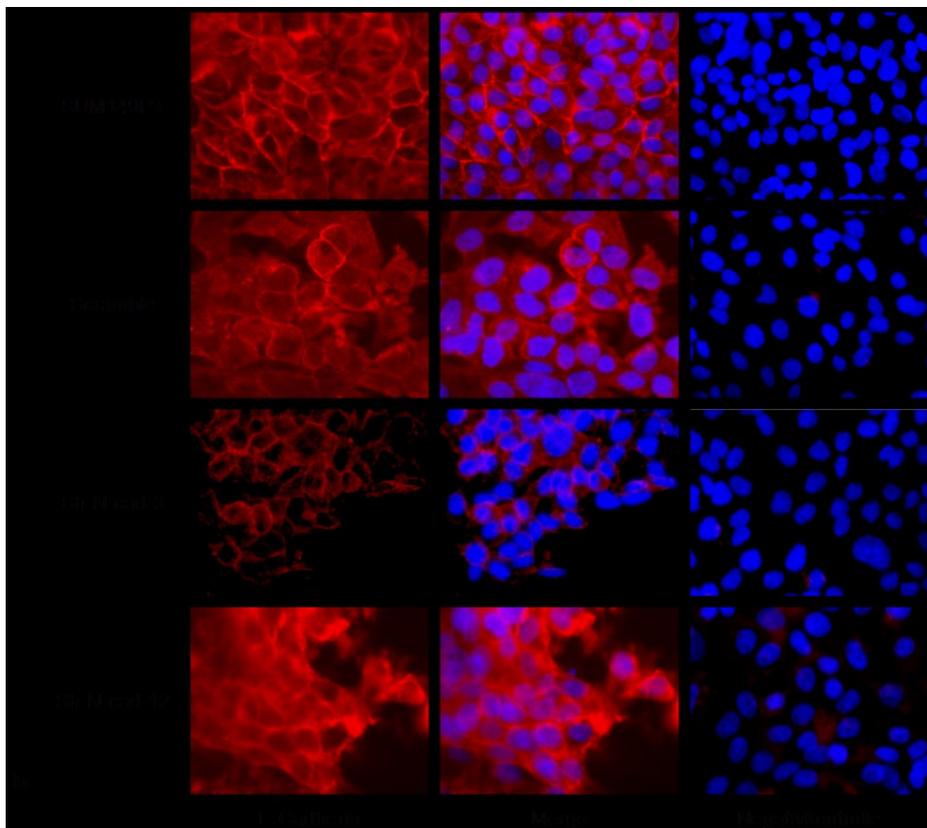
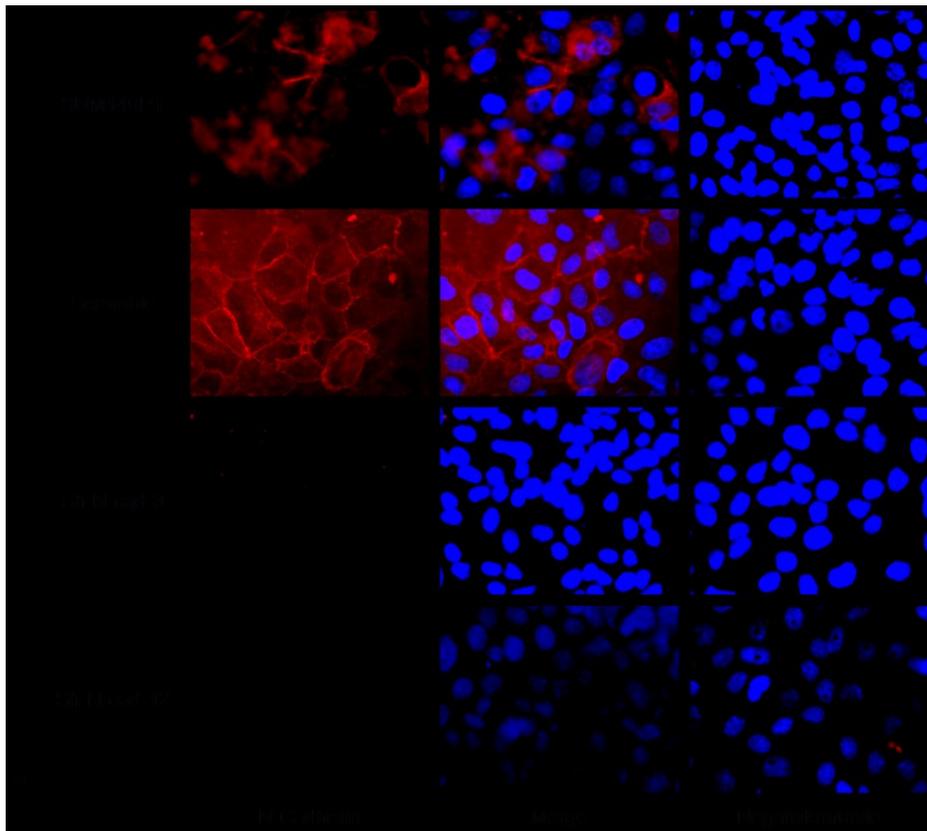


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien BT-20 und SUM149PT

- N-Cadherin-Färbung. Die BT-20 zeigen keine Expression von N-Cadherin, während bei den SUM149PT das N-Cadherin in der Zellmembran und diffus im Zellplasma lokalisiert ist.
- E-Cadherin-Färbung. Sowohl BT-20, als auch SUM149PT zeigen eine deutliche Expression von E-Cadherin in der Zellmembran.
- VE-Cadherin-Färbung. Sowohl BT-20, als auch SUM149PT zeigen eine deutliche Expression von VE-Cadherin in der Zellmembran. Der Antikörper c-19 bindet relativ unspezifisch verglichen mit dem Antikörper f-8. Abkürzungen: AK: Antikörper.



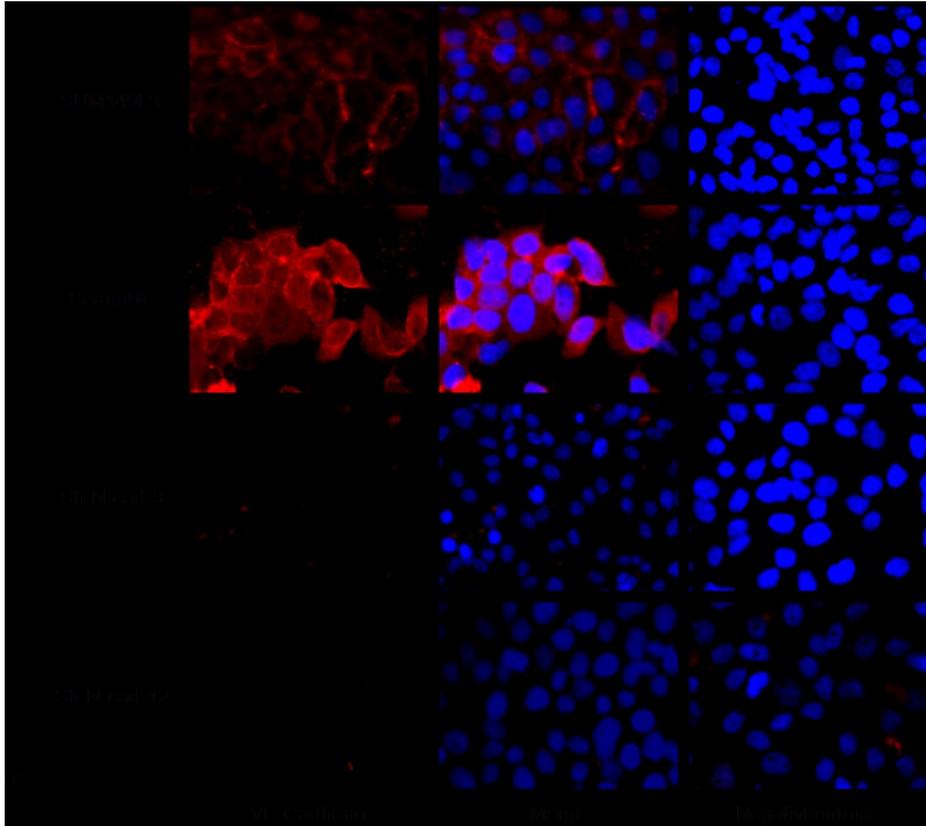


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung der Sum149PT/Scramble, sowie der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12

- a) N-Cadherin-Färbung. Die N-Cadherin defizienten Klone zeigen im Gegensatz zu den SUM149PT/Scramble keine N-Cadherin-Expression. Bei den SUM149PT/Scramble ist das N-Cadherin in der Zellmembran, aber auch diffus im Zellplasma lokalisiert.
- b) E-Cadherin-Färbung. Das E-Cadherin findet sich ohne auffällige Unterschiede sowohl bei den SUM149PT/Scramble als auch bei den N-Cadherin defizienten Klonen in der Zellmembran.
- c) VE-Cadherin-Färbung. Die N-Cadherin defizienten Klone zeigen im Gegensatz zu den SUM149PT/Scramble keine VE-Cadherin-Expression. Bei den SUM149PT/Scramble ist das N-Cadherin in der Zellmembran lokalisiert.

4.2 Einfluss des N-Cadherin auf das Proliferationsverhalten

Um den Einfluss der N-Cadherin-Defizienz auf die Proliferation zu untersuchen, wurde der unter 3.2.5 erklärte Versuchsansatz zur Bestimmung der Verdopplungszeiten mit der Zelllinie SUM149PT, den Knock-Down-Klonen und der Scramble-Kontrolle Scr2_2 durchgeführt. Zusätzlich wurde die Zelllinie BT-20 mitgeführt, um das Proliferationsverhalten von SUM149PT und BT-20 zu vergleichen. Dazu wurden Zellen jeder Zelllinie in Petrischalen ausgesät und für 24, 48, 72 und 96 h inkubiert. Zu jedem der Zeitpunkte wurden als Doppelbestimmung je zwei Wells pro Zelllinie mit DAPI gefärbt und die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Aus den erhaltenen Zellzahlen wurden die Wachstumskurven erstellt und mit Hilfe der Wachstumskonstante μ die Verdopplungszeit berechnet. Das arithmetische Mittel der aus drei Versuchsansätzen bestimmten Verdopplungszeiten pro Zelllinie ist im Balkendiagramm in Abbildung 15 dargestellt.

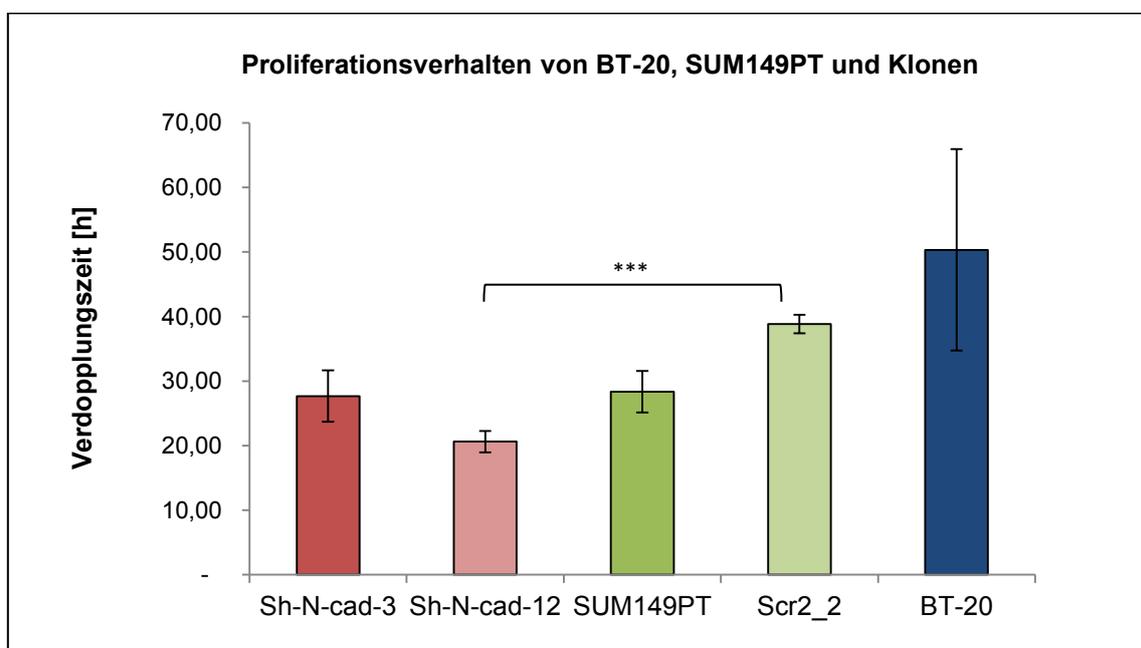


Abbildung 15: Proliferationsverhalten

Dargestellt sind die Verdopplungszeiten der Zelllinien BT-20, SUM149PT, der Scramble 2_2 und der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3 und Sh-N-cad-12 im Vergleich. (***) $p \leq 0,001$

Es zeigen sich zwar Tendenzen, jedoch kaum signifikante Proliferationsunterschiede zwischen den Zelllinien (siehe Abbildung 15). Erstaunlicherweise sind die Verdopplungszeiten der SUM149PT und des N-Cadherin defizienten Klons Sh-N-cad-3 sehr ähnlich. Im Vergleich zu den Scramble sind die Verdopplungszeiten des Klons Sh-N-cad-3 zwar tendenziell niedriger, die Proliferationsrate also tendenziell höher, nicht aber signifikant. Der N-Cadherin defiziente Klon Sh-N-cad-12 zeigt die Tendenz geringerer Verdopplungszeiten als die SUM149PT, jedoch ist auch hier kein signifikanter Unterschied

feststellbar. Lediglich zwischen dem für N- und VE-Cadherin am stärksten herunterregulierten Klon Sh-N-cad-12 und der im Vergleich zu den SUM149PT mehr N-Cadherin aufweisenden Scramble-Zelllinie zeigt sich ein signifikanter Proliferationsunterschied. Sh-N-cad-12 hat signifikant niedrigere Verdopplungszeiten und damit eine signifikant höhere Proliferationsrate als die Scramble-Kontrolle. Im Vergleich zu den SUM149PT zeigen die BT-20 die Tendenz einer höheren Verdopplungszeit und damit einer niedrigeren Proliferationsrate, jedoch auch hier ohne signifikante Unterschiede aufzuweisen.

t-Test	SUM149PT	Scr2_2
BT-20	0,1976	0,4309
Sh-N-cad-3	0,8783	0,0677
Sh-N-cad-12	0,0638	0,0006

Tabelle 6: statistische Analyse des Proliferationsverhaltens

Um festzustellen, ob zwischen den BT-20 und den Sum149PT/Scr2_2 bzw. den N-Cadherin defizienten Klonen Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 und den SUM149PT/Scr2_2 ein signifikanter Proliferationsunterschied besteht, wurde ein zweiseitiger Student-t-Test (zwei Stichproben, ungleiche Varianz) durchgeführt. Angegeben ist der p-Wert.

Tendenziell scheint das N-Cadherin die Proliferation hier also eher zu hemmen. Anhand dieser nicht signifikanten Ergebnisse lassen sich jedoch keine definitiven Aussagen darüber machen, ob das N-Cadherin einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der verwendeten humanen Brustkrebszelllinien hat.

4.3 Einfluss des N-Cadherin auf die Sphäroidbildung

Es bestehen große Unterschiede zwischen einer flachen Einzelschicht aus Zellen und einem komplexen dreidimensionalen Gewebe (Abbott, 2003). Tumore wachsen *in vivo* in dreidimensionalen Geweben. Um dem *in vitro* etwas näher zu kommen, können dreidimensionale Zellkulturmodelle eingesetzt werden. (Kunz-Schughart et al., 2004).

Der Einfluss des N-Cadherin auf das dreidimensionale Wachstum der Zellen wurde mit Hilfe des unter 3.2.6 erklärten Sphäroidversuches in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kunz-Schughart des OncoRay Dresden untersucht. Es wurden die Zelllinie SUM149PT, die N-Cadherin-defizienten Klone, sowie die Scramble-Kontrolle Scr2_2 mitgeführt. Von jeder der verwendeten Zelllinien wurden in je 16 Wells einer mit Agarose beschichteten 96-Wellplatte 4000 Zellen, 8000 Zellen bzw. 10.000 Zellen ausgesät. Nach einer Inkubation von vier Tagen wurden die Wells unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert, sowie ein Mediumwechsel durchgeführt. Weitere Aufnahmen und Mediumwechsel fanden an Tag 7, 9, 11 und 14 nach Aussaat statt. Insgesamt wurde der Versuch zweimal angesetzt.

Bei allen verwendeten Zelllinien bildeten sich bei einer eingesetzten Zellzahl von 4000, 8000 oder 10.000 Zellen stabile Sphäroide aus, die jedoch einen breiten Rand an nicht integrierten Zellen aufwiesen. In Abbildung 16 sind zentral die dunkel berandeten Sphäroide zu erkennen. Um den dunklen Kern sind die nicht in die Sphäroide integrierten losen Zellen als Wolke zu erkennen.

Es ließen sich keine signifikanten Größenunterschiede der Sphäroide der verschiedenen Zelllinien nachweisen. Bei keiner der mitgeführten Zelllinien konnte zwischen Tag 4 und Tag 14 nach Aussaat der Zellen ein deutlich sichtbares Wachstum der Sphäroide festgestellt werden. Ab Tag 11 wurden die Sphäroide tendenziell wieder kleiner, was vermutlich auf ein Absterben der Zellen zurückzuführen ist.

Es ließ sich hier kein Einfluss des N-Cadherin auf die Sphäroidbildung der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT nachweisen.

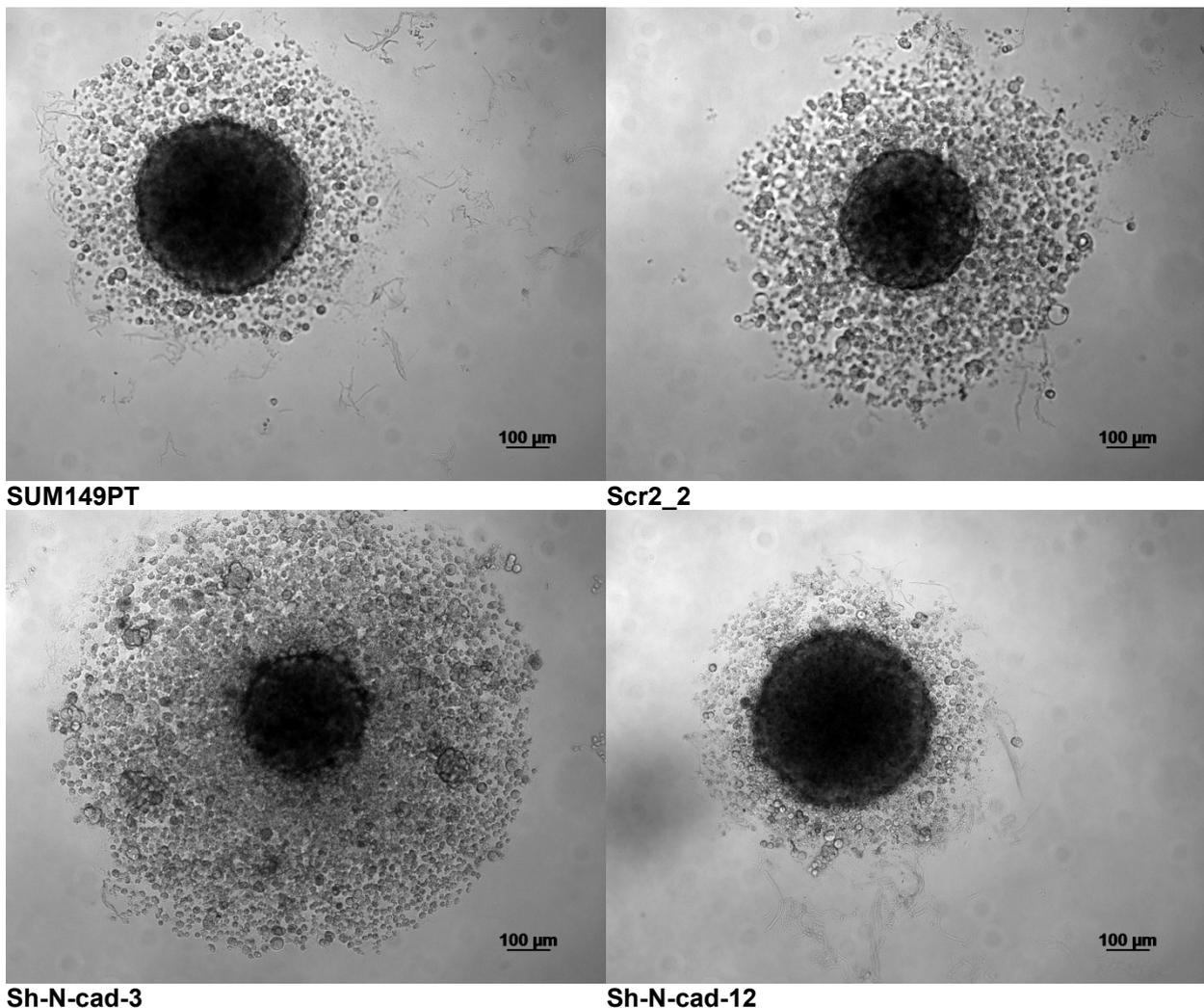


Abbildung 16: Beispielbilder von Sphäroiden an Tag 4 nach Aussaat (8000 Zellen/Well)

4.4 Einfluss des N-Cadherin auf das Migrationsverhalten

Die Zellmigration ist ein physiologischer Prozess, der in der Embryogenese, bei Regeneration und im Immunsystem von Bedeutung ist (Yamaguchi & Condeelis, 2007). Die Zellmotilität spielt aber auch bei pathologischen Prozessen wie der Metastasierung eine Rolle. So müssen Tumorzellen migratorische Fähigkeiten besitzen, um durch das den Primärtumor umgebende Stroma zu Blut- oder Lymphgefäßen zu gelangen (Weinberg, 2014).

Um den Einfluss der N-Cadherin-Defizienz auf die Migration zu untersuchen, wurde der unter 3.2.7 erklärte Boyden-Chamber-Versuch mit der Zelllinie SUM149PT, den N-Cadherin-Knock-Down-Klonen und Scramble-Kontrollen durchgeführt. Zusätzlich wurde die Zelllinie BT-20 mitgeführt, um das Migrationsverhalten von SUM149PT und BT-20 zu vergleichen. Dazu wurden die Zellen in Medium ohne FKS in ein Transwell mit poriger Membran ausgesät, welches in ein Well, das Medium mit FKS enthielt, eingehängt wurde. Durch die Chemotaxis wurden die Zellen dazu angeregt durch die Poren der Membran zum Medium mit FKS zu wandern. Die migrierten Zellen wurden mit DAPI gefärbt und die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Das arithmetische Mittel der aus den drei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen erhaltenen Zellzahlen wurde im Balkendiagramm (siehe Abbildung 17) aufgetragen.

Zu Beginn der Versuche wurde bei der Zelllinie BT-20 getestet, ob die im Well eingesetzte FKS-Konzentration, die die Zellen chemotaktisch dazu anregt durch die Poren der Transwellmembran zu wandern, einen Einfluss auf die Anzahl der migrierten Zellen hat. Es wurden vier voneinander unabhängige Versuche mit je einem Zweifachansatz durchgeführt. Dabei ist zwar kein signifikanter (siehe Tabelle 7a) Unterschied im Migrationsverhalten vorhanden, es wurden jedoch tendenziell bei einer höheren FKS-Konzentration von 20% mehr migrierte Zellen gezählt als bei Einsatz einer FKS-Konzentration von 5% (siehe Abbildung 17a). Für alle weiteren Migrationsversuche wurde eine FKS-Konzentration von 20% gewählt.

Bei den Migrationsverhalten von BT-20 und SUM149PT im Vergleich zeigt sich, dass die BT-20 bei Einsatz der gleichen FKS-Konzentration hochsignifikant höhere migratorische Eigenschaften haben, als die SUM149PT (siehe Abbildung 17a und Tabelle 7a). Es wurden insgesamt sieben voneinander unabhängige Versuche je als Doppelbestimmung durchgeführt.

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3 und Sh-N-cad-12 verglichen mit den Kontrollen Sum149PT und Scr2_2 wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei bei den ersten beiden Versuchen pro Zelllinie eine Doppelbestimmung, beim letzteren eine Vierfachbestimmung erfolgte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17b und Tabelle 7b dargestellt.

Dabei wird deutlich, dass beide N-Cadherin defizienten Klone eine hochsignifikant geringere Migration als die SUM149PT, und eine höchstsignifikant geringere Migration als die Scr2_2 zeigen. Wie sich bei RT-PCR und q-PCR zeigte, exprimiert Scr2_2 eine etwas höhere N-Cadherin-Konzentration als die SUM149PT, sodass sich die höhere Signifikanz der N-Cadherin defizienten Klone bezogen auf die Scr2_2 aus dem größeren Expressionsunterschied des N-Cadherin ergibt. Tendenziell zeigt auch der für N-Cadherin am weitesten herabregulierte Klon Sh-N-cad-12 eine geringere Zahl migrierter Zellen als der Klon Sh-N-cad-3.

t-Test	BT-20 (20%FKS)	t-Test	SUM149PT	Scr 2_2
SUM149PT (20%FKS)	0,010	Sh-N-cad-3	0,0149	0,0002
a) BT-20 (5%FKS)	0,119	b) Sh-N-cad-12	0,0066	0,0001

Tabelle 7: statistische Analyse des Migrationsverhaltens

- a) + b) Statistische Analysen der Migrationsversuche zu BT-20 und SUM149PT und zu den Migrationsversuchen der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 und den Kontrollen SUM149PT/Scr2_2 mittels zweiseitigem Student-t-Test (zwei Stichproben, ungleiche Varianz). Angegeben ist der p-Wert.

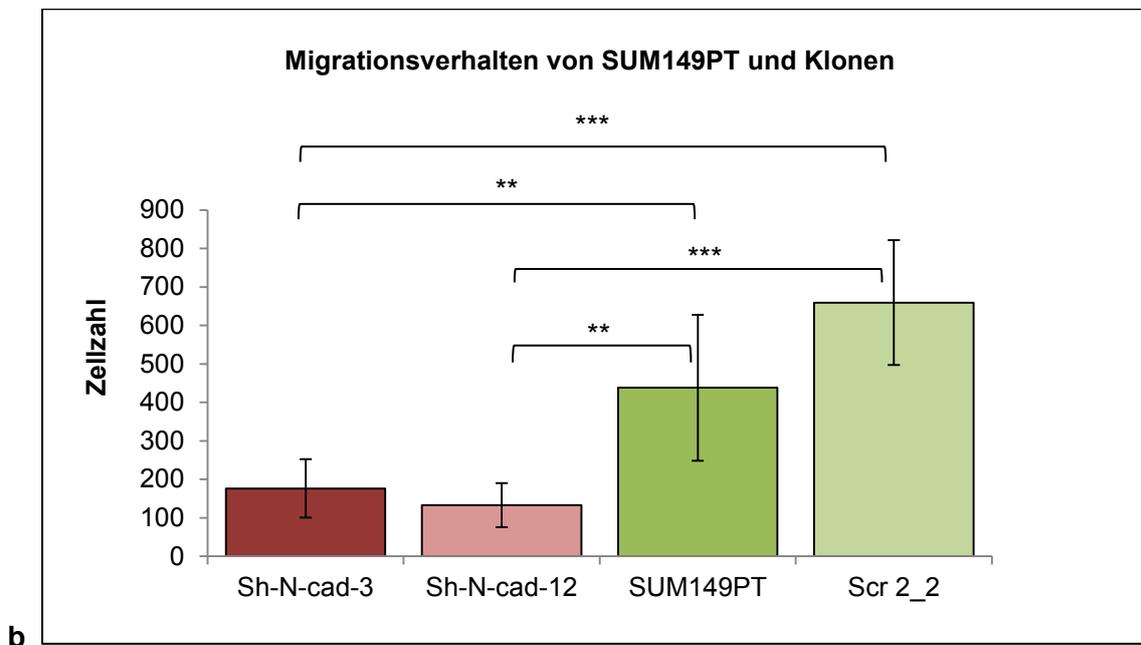
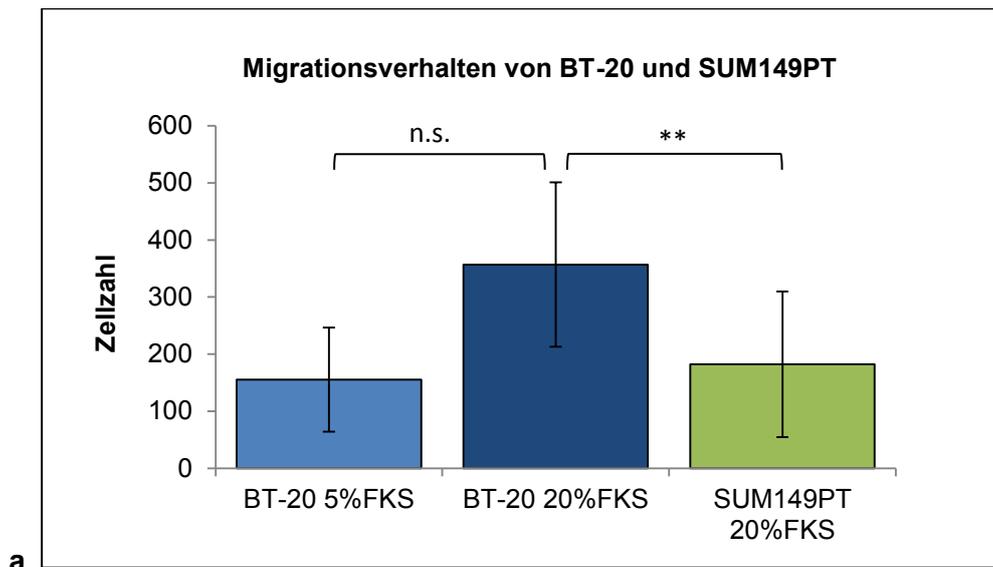


Abbildung 17: Migrationsverhalten

- a) Migrationsversuche der Zelllinie BT-20 mit unterschiedlichen FKS-Konzentrationen von 5% und 20%, sowie von BT-20 und SUM149PT im Vergleich. Die Konzentration des FKS beeinflusst die Zahl der migrierten Zellen nicht signifikant. Die BT-20 zeigen bei gleicher FKS-Konzentration im Vergleich zu den SUM149PT eine hochsignifikant höhere Anzahl migrierter Zellen.
- b) Migrationsversuche der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad3/Sh-N-cad-12 und der Kontrollen SUM149PT/Scr2_2. Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 zeigen im Vergleich zu den Kontrollen eine hochsignifikant verringerte Migration. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

Um die Zellbeweglichkeit und Fähigkeit zur Migration noch auf andere Weise zu testen, wurden *in vitro* Wundheilungsversuche durchgeführt (siehe 3.2.8).

In Petrischalen mit zweikammrigem Einsatz (Ibidi 30 μ -Dish 35mm high Culture-Insert) wurden die Zellen ausgesät und kultiviert, bis die Zellen konfluent waren. Nachdem der Einsatz entnommen worden war, wurde die freie Fläche zwischen den beiden Zellrasen zum Zeitpunkt 0, 12h, 15h, 18h, 21h und 24h fotografiert. Die Werte der von den Zellen neu bedeckten Fläche wurden in einem Diagramm über der Zeit aufgetragen. Der Anstieg einer eingefügten Trendlinie entspricht hierbei der Flächenbedeckungsrate (surface coverage rate=SCR) in $\mu\text{m}^2/\text{h}$, also der Geschwindigkeit mit der die aufeinander zuwandernden Zellen eine Fläche bedecken. Grundsätzlich spielt hier neben den migratorischen Fähigkeiten auch die Proliferation eine Rolle. Bei Durchführung des Versuches innerhalb von 24 h ist die Beteiligung der Proliferation am Schließen der freien Fläche jedoch sehr gering.

Die Zellen, die in den Zellkulturflaschen und Petrischalen stets problemlos wuchsen, starben in den Wundheilungsschalen (Ibidi 30 μ -Dish 35mm high Culture-Insert) teilweise nach einigen Stunden ab. Trotz intensiver Fehlersuche konnte der Grund hierfür nicht herausgefunden werden. Es wurden 9 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, bei denen die Zelllinien SUM149PT, Sh-N-cad-3, Sh-N-cad-12, Scr2_2 und Scr2_6 mitgeführt wurden, wobei entweder nur die N-Cadherin defizienten Klone oder die Kontrollen überlebten, so dass keine Vergleiche angestellt werden konnten. Tendenziell zeigten die N-Cadherin defizienten Klone jedoch eine geringere SCR als die Kontrollen SUM149PT/Scramble. Lediglich bei einem der Versuche, bei dem von jeder Zelllinie 5 Schalen angesetzt wurden, konnte schließlich eine vergleichende Statistik erstellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 und Tabelle 8 dargestellt. Dabei zeigen die N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3 und Sh-N-cad-12 im Vergleich zu den Kontrollen SUM149PT und Scr2_2 eine hochsignifikant verringerte SCR. Die Geschwindigkeit, mit der die Zellrasen der N-Cadherin defizienten Klone die freie Fläche bewachsen, ist also signifikant verringert. Eine Bestätigung dieses Ergebnisses in weiteren unabhängigen *in vitro* Wundheilungsversuchen wäre wünschenswert. Aufgrund der Tatsache, dass die Ursache für das Absterben der Zellen in den ibidi-dishes nicht ermittelt werden konnte, wurde die Versuchsreihe jedoch gestoppt. Dennoch stützen die vorhandenen Ergebnisse der *in vitro* Wundheilungsversuche die Ergebnisse der Migrationsversuche mittels Boyden-Chamber.

Die N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 zeigten also sowohl im Migrationsversuch mittels Boyden-Chamber, als auch im *in vitro* Wundheilungsversuch im Vergleich zu den Kontrollen SUM149PT/Scramble eine hochsignifikant verringerte Migration. N-Cadherin fördert somit das Migrationsverhalten der humanen Brustkrebszelllinie SUM149PT.

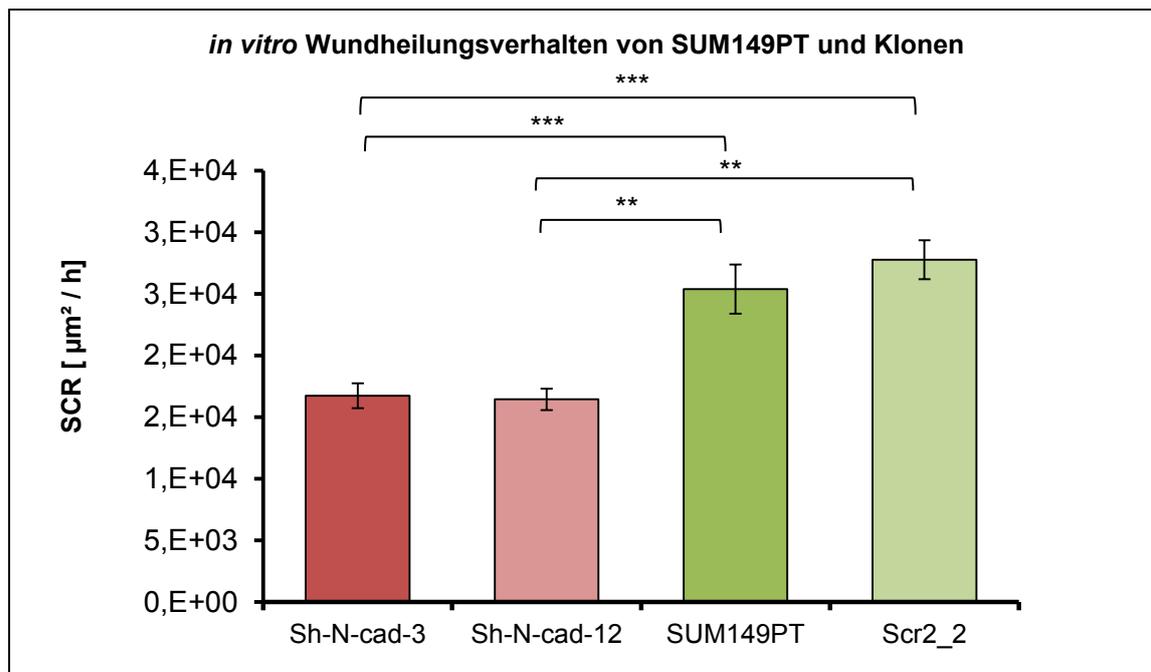
t-Test	SUM149PT	Scr2_2
Sh-N-cad-3	0,00016	0,00009
Sh-N-cad-12	0,00207	0,00174

Tabelle 8: statistische Analyse des Wundheilungsverhaltens

Statistische Analysen der Wundheilungsversuche der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 und den Kontrollen SUM149PT/Scr2_2 mittels zweiseitigem Student-t-Test (zwei Stichproben, ungleiche Varianz). Angegeben ist der p-Wert.

Zelllinie	SCR I	SCR II	SCR III	SCR IV	SCR V	MW
Sh-N-cad-3	17817,00	16035,00	15359,00	17312,00	17149,00	16734,40
Sh-N-cad-12	16513,00	15547,00	17287,00			16449,00
SUM149PT	24792,00	23763,00	27619,00			25391,33
Scr2_2	28893,00	26657,00				27775,00

a



b

Abbildung 18: *in vitro* Wundheilungsverhalten

- In der Tabelle sind die berechneten SCR der im Versuch überlebenden Zelllinien enthalten. Von Sh-N-cad-3 überlebten die Zellen in 5 von 5 Versuchsansätzen und die Ergebnisse konnten ausgewertet werden, von Sh-N-cad-12 3/5, von dem SUM149PT 3/5 und von den SCR2_2 2/5. (MW=Mittelwert)
- In der Abbildung sind die arithmetischen Mittel der im Versuch bestimmten SCR der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien SUM149PT/Scr2_2 aufgetragen. Die N-Cadherin defizienten Klone zeigen dabei eine hochsignifikant geringere SCR als die Kontrollen. SCR: surface coverage rate. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

4.5 Einfluss des N-Cadherin auf das Invasionsverhalten

Während der Metastasierung benötigen Tumorzellen invasive Fähigkeiten, um die Basalmembran durchbrechen, umgebendes Gewebe passieren und Blut- und Lymphgefäße infiltrieren zu können (siehe 1.2). Der Einfluss des N-Cadherin auf die Invasion wurde anhand des unter 3.2.9 erklärten Versuchsansatzes an den Zelllinie SUM149PT, den N-Cadherin-Knock-Down-Klonen Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 und der Scramble-Kontrolle Scr2_2 durchgeführt. Zusätzlich wurde die Zelllinie BT-20 mitgeführt, um das Invasionsverhalten von SUM149PT und BT-20 zu vergleichen. Dazu wurden die Zellen wie beim Boyden-Chamber-Migrationsversuch in Medium ohne FKS in ein Transwell mit poriger Membran ausgesät, welches in ein Well, das Medium mit FKS enthielt, eingehängt wurde. Auf der porigen Membran befand sich jedoch zur Simulation der extrazellulären Matrix noch eine Schicht aus Matrigel. Durch die Chemotaxis wurden die Zellen dazu angeregt durch das Matrigel und die Poren der Membran zum Medium mit FKS zu wandern. Die invasiven Zellen wurden mit DAPI gefärbt und die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei zweimal eine Doppel-, einmal eine Vierfachbestimmung pro Zelllinie erfolgte.

Beim Vergleich des Invasionsverhaltens von BT-20 und SUM149PT zeigen sich dabei keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 19a und Tabelle 9a).

Bei der Auswertung der Invasion der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3 und Sh-N-cad-12 im Vergleich zu den Kontrollen SUM149PT und Scr2_2 zeigt sich, dass beide N-Cadherin defizienten Klone eine hochsignifikant geringere Zahl invasiver Zellen aufweisen, als die Kontrollen (siehe Abbildung 19b und Tabelle 9b).

t-Test	SUM149PT
BT-20	0,14

t-Test	SUM149PT	Scr2_2
Sh-N-cad-3	0,0001	0,0056
Sh-N-cad-12	0,0003	0,0088

Tabelle 9: statistische Analyse des Invasionsverhaltens

- Um festzustellen, ob zwischen den BT-20 und den Sum149PT ein signifikanter Invasionsunterschied besteht, wurde anhand der erhaltenen Werte ein zweiseitiger Student-t-Test (zwei Stichproben, ungleiche Varianz) durchgeführt. Dabei zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Angegeben ist der p-Wert.
- Um festzustellen, ob zwischen den N-Cadherin defizienten Klonen Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 und den Kontrollen SUM149PT/Scr2_2 ein signifikanter Invasionsunterschied besteht, wurde anhand der erhaltenen Werte ein zweiseitiger Student-t-Test (zwei Stichproben, ungleiche Varianz) durchgeführt. Angegeben ist der p-Wert.

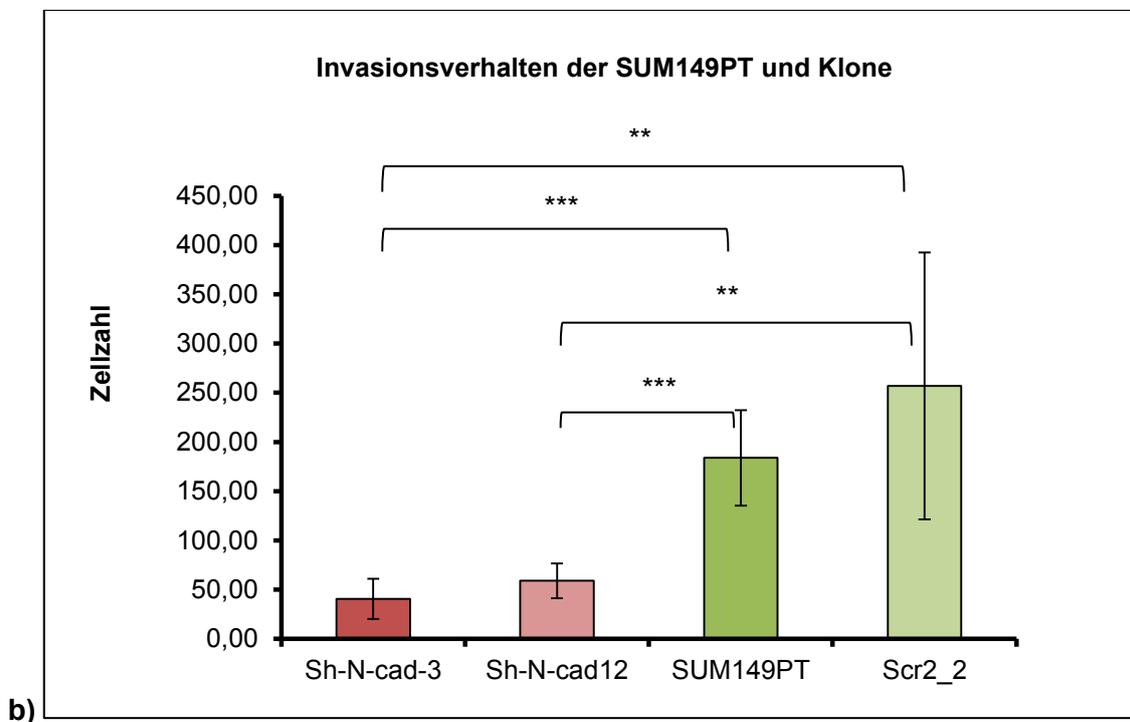
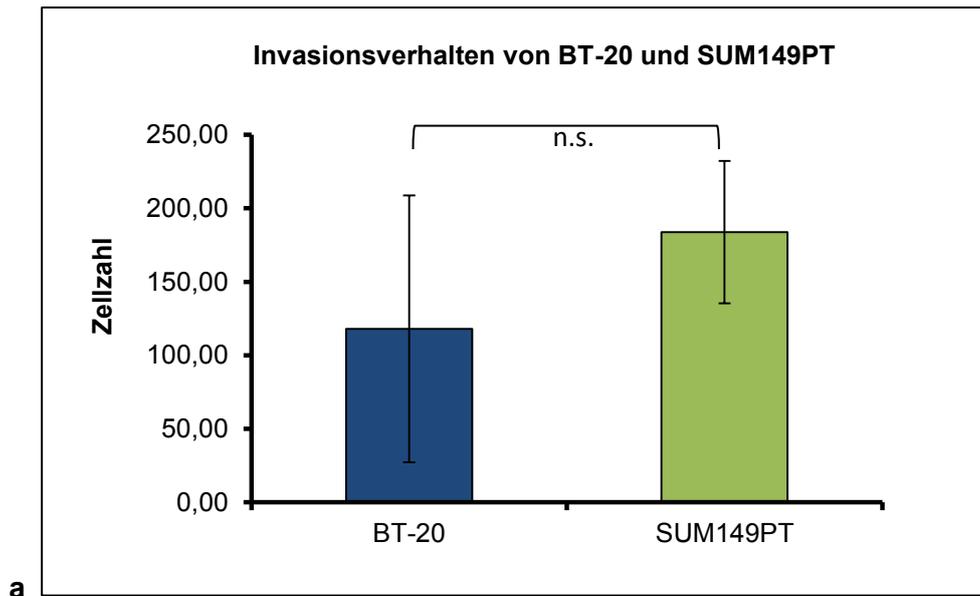


Abbildung 19: Invasionsverhalten

- a) Invasionsversuche der Zelllinien BT-20 und SUM149PT im Vergleich. In dieser Abbildung ist das arithmetische Mittel der aus den drei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen erhaltenen Zellzahlen der Zelllinien BT-20 und SUM149PT im Vergleich aufgetragen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen BT-20 und SUM149PT.
- b) Invasionsversuche der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 und der Kontrollen SUM149PT/Scr2_2. In dieser Abbildung ist das arithmetische Mittel der aus den drei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen erhaltenen Zellzahlen der Zelllinien Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 und der Kontrollen SUM149PT/Scr2_2 im Vergleich aufgetragen. Die N-Cadherin defizienten Klone zeigen eine hochsignifikant geringere Invasion als die Kontrollen. (n.s.=nicht signifikant, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

5 Diskussion

Die Inzidenz für Brustkrebs ist weltweit steigend und in Ländern mit geringem Bruttoinlandsprodukt pro Kopf nehmen auch die Sterbefälle stetig zu (Holst et al., 2007; Yip et al., 2008; Porter, 2009). In Deutschland ist die Sterberate trotz gesteigerter Erkrankungszahlen seit 1998 in etwa gleich geblieben (nach Angaben des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts für 2013), was hauptsächlich auf Diagnosestellungen zu einem früheren Zeitpunkt der Tumorentstehung aufgrund von Früherkennungsuntersuchungen zurückzuführen ist, aber auch auf verbesserte Therapieansätze. Trotzdem bleibt die Therapie von BrustkrebspatientInnen, gerade bei tripelnegativen Mammakarzinomen, die nicht auf eine hormonelle Therapie ansprechen, eine Herausforderung. Untersuchungen zu molekularen Mechanismen von Brustkrebsentstehung und -metastasierung sind daher von großer Wichtigkeit, um neue Therapieansätze zu entwickeln.

Cadherine spielen nicht nur in physiologischen Prozessen wie der Embryogenese, sondern auch in pathologischen Prozessen wie der Tumorprogression eine Rolle (Bex & van Roy, 2001; Cavallaro & Christofori, 2001; Breier et al., 2014). In dieser Arbeit wurde an humanen Mammakarzinomzelllinien der Einfluss einer Defizienz von N-Cadherin auf die Expression von E- und VE-Cadherin, sowie auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen *in vitro* untersucht. Die invasive und tripelnegative Mammakarzinomzelllinie SUM149PT exprimiert sowohl E-, N-, als auch VE-Cadherin und wurde daher zu den Versuchszwecken ausgewählt. Es wurden die mit shRNA transfizierten N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3 und Sh-N-cad-12 mit den SUM149PT und den Scramble-Kontrollen Scr2_2 und Scr2_6 verglichen. Um klonale Effekte auszuschließen wurden jeweils zwei N-Cadherin-Knock-Down-Klone und ein bis zwei Scramble-Kontroll-Klone untersucht. Außerdem wurde in einigen Versuchen die humane Brustkrebszelllinie BT-20 mitgeführt und ein Vergleich mit den SUM149PT durchgeführt. Die BT-20 exprimieren zwar E- und VE-Cadherin, jedoch kein N-Cadherin (siehe 4.1: Abbildung 10, Abbildung 12, Abbildung 13).

Morphologisch zeigten sich keine erkennbaren Unterschiede zwischen den N-Cadherin defizienten Klonen und den Kontrollen. Die BT-20 zeigen durch die Spindelform der Zellen im Vergleich zu den SUM149PT einen etwas mehr zu Mesenchymzellen tendierenden Phänotyp (siehe 4.1: Abbildung 9).

5.1 N-Cadherin-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Expression und subzelluläre Lokalisation von E-Cadherin in der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT

Mittels RT-PCR, q-PCR, Western Blot und Immunfluoreszenzanalysen wurde die Expression von N-, sowie E- und VE-Cadherin bei den N-Cadherin defizienten Klonen Sh-N-cad-3 und Sh-N-cad-12 im Vergleich zu den SUM149PT und den Scramble-Kontrollen Scr2_2 und Scr2_6 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Herabregulierung von N-Cadherin erfolgreich war. Sowohl Sh-N-cad-3, als auch Sh-N-cad-12 zeigen eine deutlich geringere N-Cadherin-Expression als die Kontrollen (siehe 4.1: Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12). Die durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen zeigen, dass N-Cadherin bei den SUM149PT und den Scramble nicht nur an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist, sondern auch diffus über die Zellmembran verteilt ist. Die N-Cadherin defizienten Klone zeigen bei der Immunfluoreszenz keine erkennbare Expression von N-Cadherin (siehe 4.1: Abbildung 14).

Die E-Cadherin-Expression und Lokalisation scheinen durch die Herabregulierung des N-Cadherins nicht beeinflusst zu werden; es zeigen sich bei RT-PCR, q-PCR und Western Blot keine deutlichen Unterschiede in der Expression von E-Cadherin bei den N-Cadherin defizienten Klonen im Vergleich zu den Kontrollen (siehe 4.1: Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12). In der Immunfluoreszenz ist E-Cadherin sowohl bei den N-Cadherin defizienten Klonen, als auch bei den Kontrollen hauptsächlich an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (siehe 4.1: Abbildung 14).

Der Verlust der E-Cadherin-Expression oder -Funktion wurde lange als einer der Hauptgründe betrachtet, der zum Verlust von Kontaktinhibition und Polarität, zum Ablösen der Tumorzellen vom Primärtumor und damit zu Metastasierung führt (Birchmeier et al., 1996; Bracke et al., 1996; Hazan et al., 2004). Neben der Herabregulierung von E-Cadherin geht aber auch die Heraufregulation von N-Cadherin mit dem Tumorprogressionspotenzial einher. Verstärkte Expression von N-Cadherin wurde bei Mammakarzinom-, Prostatakarzinom- und Melanomzellen gefunden (Hazan et al., 1997; Sanders et al., 1999; Tomita et al., 2000). Hollestelle und Kollegen konnten an Versuchen mit 38 Brustkrebszelllinien zeigen, dass in menschlichen Mammakarzinomzellen ein Verlust von E-Cadherin nicht zwingend notwendig ist, um den Prozess der EMT auszulösen (Hollestelle et al., 2013). Eine forcierte Expression von N-Cadherin in den E-Cadherin positiven Brustkrebszelllinien BT-20 und MCF-7 führte nicht zu einer Reduktion der E-Cadherin-Expression und trotzdem zu erhöhtem Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen (Nieman et al., 1999; Hazan et al., 2000). Umgekehrt resultiert eine exogene E-Cadherin-Expression bei der N-Cadherin-positiven, E-Cadherin-negativen Brustkrebszelllinie MDA-

MB-435 weder in einer Reduktion des N-Cadherin-Levels, noch in einer Verminderung des Invasionspotenzials der Zellen (Hazan et al., 2000). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, führt eine Herabregulierung des N-Cadherin in der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT weder zu einer Änderung der Expression, noch der Lokalisation von E-Cadherin. All diese Ergebnisse sprechen dafür, dass N-Cadherin über die tumorsuppressive Wirkung des E-Cadherin dominiert und auch in der Anwesenheit von E-Cadherin metastasierungsfördernd wirken kann.

5.2 N-Cadherin-Defizienz führt zu deutlicher Herabregulierung der VE-Cadherin-Expression in der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT

Erstaunlicherweise ist die VE-Cadherin-Expression bei den N-Cadherin defizienten Klonen im Vergleich zu den SUM149PT und den Scramble-Kontrollen deutlich verringert (siehe 4.1: Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12). In der Immunfluoreszenz zeigt sich bei den N-Cadherin defizienten Klonen nur noch eine sehr schwache diffuse Färbung von VE-Cadherin, während bei den SUM149PT und den Scramble eine Lokalisation von VE-Cadherin an den Zell-Zell-Kontakten nachweisbar ist (siehe 4.1: Abbildung 14). Ähnliche Ergebnisse präsentierten Luo & Radice 2005, die zeigten, dass eine Herabregulierung von N-Cadherin durch siRNA in humanen Endothelzellen zu einer signifikanten Herabregulierung von VE-Cadherin und dessen intrazellulärem Bindungspartner p120ctn führt (Luo & Radice, 2005). Umgekehrt führte ein Knock-down von VE-Cadherin nicht zu einer Expressionsänderung von N-Cadherin. Die Autoren vertreten die Ansicht, dass N-Cadherin ein up-stream-Regulator von VE-Cadherin ist (Luo & Radice, 2005). Auch in der murinen Brustkrebszelllinie Ep5ExTu führte eine Herabregulierung von N-Cadherin zu einer Reduzierung der VE-Cadherin-Expression und dessen Verlust an den Zell-Zell-Kontakten. Umgekehrt war auch hier keine Regulation des N-Cadherin durch das VE-Cadherin feststellbar (Rezaei et al., 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass auch in humanen Mammakarzinomzelllinien N-Cadherin die Expression von VE-Cadherin beeinflussen kann. Die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen sind jedoch noch unbekannt.

Um die Auswirkungen einer Herabregulierung des N-Cadherin, die hier zu einer Herabregulierung von VE-Cadherin führt, mit den Auswirkungen einer alleinigen Herabregulierung von VE-Cadherin zu vergleichen, werden im Folgenden die Ergebnisse dieser Arbeit früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe, insbesondere denen von Frau Antje Schmidt, gegenübergestellt. In Schmidts Arbeit wurden Proliferations-, Migrations- und

Invasionsverhalten von mit shRNA transfizierten VE-Cadherin defizienten Klonen der Brustkrebszelllinie SUM149PT untersucht (Schmidt, 2014).

5.3 N-Cadherin-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Proliferation der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT

Um den Einfluss des N-Cadherin auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurde der unter 3.2.5 erläuterte Verdopplungszeitversuchsansatz durchgeführt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation zwischen N-Cadherin defizienten Klonen und SUM149PT/Scramble-Kontrollen (siehe 4.2: Tabelle 6, Abbildung 15). Auch im Vergleich zwischen SUM149PT und BT-20, die kein N-Cadherin exprimieren, zeigen sich keine signifikanten Proliferationsunterschiede.

Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Defizienz von VE-Cadherin in der Zelllinie SUM149PT zu ähnlichen Ergebnissen führt. Auch hier zeigt sich keine Änderung des Wachstumsverhaltens zwischen VE-Cadherin defizienten Klonen und Kontrollen (Schmidt, 2014). Andere Ergebnisse präsentierten Labelle et al. in ihren Untersuchungen zum VE-Cadherin an murinen Zellen. Hier stimuliert VE-Cadherin über den TGF- β -Signalweg die Tumorpheriferation und -progression *in vitro* (Labelle et al., 2008). Die Tatsache, dass sich zwischen VE-Cadherin defizienten Klonen und Kontrollen der menschlichen Brustkrebszelllinie SUM149PT keine signifikanten Änderungen des Wachstumsverhaltens zeigen (Schmidt, 2014), legt nahe, dass VE-Cadherin in humanen Mammakarzinomzelllinien *in vitro* nicht den TGF- β -Signalweg stimuliert, sondern hier andere proliferative Signalwege von Bedeutung sind.

5.4 N-Cadherin-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Sphäroidbildung der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT

Mittels der unter 3.2.6 beschriebenen Sphäroidversuche wurde der Einfluss des N-Cadherin auf das dreidimensionale Wachstum der Mammakarzinomzelllinie SUM149PT untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Größe und Wachstum der Sphäroide zwischen den N-Cadherin defizienten Klonen Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12 und den Kontrollen SUM149PT/Scr2_2. N-Cadherin scheint bei der Mammakarzinomzelllinie SUM149PT also sowohl auf die Proliferation im Monolayer, als auch in einer dreidimensionalen Struktur *in vitro* keinen Einfluss zu haben.

Lee und Kollegen fanden heraus, dass bei sehr großen Sphäroiden der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC9 β 6KDFyn N-Cadherin vermehrt exprimiert wird (Lee et

al., 2014). Im Mausmodell zeigten N-Cadherin defiziente Tumore der Zelllinie Ep5ExTu *in vivo* ein höchstsignifikant verringertes Tumorwachstum; *in vitro* zeigte sich bei für N-Cadherin herabregulierten Klonen der Zelllinie Ep5ExTu im Vergleich zu den Kontrollen jedoch interessanterweise keine Änderung des Proliferationsverhaltens (Rezaei, 2011). Umfangreiche weitere Studien unter Verwendung weiterer Zelllinien wären nötig, um einen eventuellen Einfluss des N-Cadherin auf die Proliferation humaner Mammakarzinomzellen *in vivo* zu untersuchen.

Eine induzierte Expression von VE-Cadherin in einer N-Cadherin defizienten Zelllinie führte im Vergleich zu den Kontrollen ohne forcierte Expression von VE-Cadherin zu keiner signifikanten Veränderung des Tumorwachstums *in vivo* (Rezaei, 2011). Dies könnte darauf hindeuten, dass die tumorwachstumsfördernde Wirkung von VE-Cadherin hier durch den Expressionsgrad von N-Cadherin reguliert wird (Rezaei, 2011).

5.5 N-Cadherin-Defizienz führt zu signifikant verringerter Migration der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT

Anhand von Boyden-Chamber-Assays (siehe 3.2.7) und *in vitro* Wundheilungsversuchen (siehe 3.2.8) wurde der Einfluss der N-Cadherin-Defizienz auf das Migrationsverhalten untersucht. Die N-Cadherin defizienten Klone zeigen eine hochsignifikant verringerte Migration im Vergleich zu den SUM149PT und den Scramble-Kontrollen (siehe 4.4: Boyden-Chamber-Versuch: Tabelle 7, Abbildung 17; Wundheilungsversuch: Tabelle 8, Abbildung 18). Interessanterweise korreliert die Zahl der migrierten Zellen der Klone mit der in RT-PCR, q-PCR und Western Blot nachgewiesenen Expressionsstärke von N-Cadherin. Der Expressionsgrad von N-Cadherin in humanen Mammakarzinomzellen könnte damit in direktem Zusammenhang mit den migratorischen Fähigkeiten metastasierender Zellen stehen. Die Arbeitsgruppe um Sandig stellte fest, dass bei Zugabe eines Anti-N-Cadherin-Antikörpers die Migration von Melanomzellen durch eine Endothelzellschicht drastisch verlangsamt wurde (Sandig et al., 1997). Hazan und Kollegen zeigten bereits, dass eine forcierte Expression von N-Cadherin in der Brustkrebszelllinie MCF-7 zu signifikant erhöhter Migration *in vitro* und verstärkter Metastasierung im Mausmodell *in vivo* führt (Hazan et al., 2000). Umgekehrt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Herabregulierung von N-Cadherin zu einer signifikanten Verringerung des Migrationspotenzials der humanen Brustkrebszelllinie SUM149PT führt.

Ähnliche Ergebnisse erzielte Schmidt in ihren Migrationsversuchen zu VE-Cadherin defizienten Klonen der Zelllinie SUM149PT. Die VE-Cadherin-Knock-down-Klone zeigen ein signifikant verringertes Migrationsverhalten verglichen mit den SUM149PT und den

Scramble-Kontrollen (Schmidt, 2014). Auch VE-Cadherin defiziente murine Brustkrebszellen migrieren signifikant langsamer als die Kontrollen (Labelle, 2007).

Über welche Signalwege N- und VE-Cadherin die zelluläre Migration fördern, ist nicht vollständig geklärt. Chung und Kollegen fanden heraus, dass N-Cadherin durch eine Unterdrückung von AKT-3 die Zellmotilität erhöhen kann (Chung et al., 2013).

Die BT-20, die kein N-Cadherin exprimieren, haben im Vergleich zu den SUM149PT eine signifikant höhere Zahl migrierender Zellen (siehe 4.4: Tabelle 7, Abbildung 17). Da es sich um zwei unterschiedliche Zelllinien handelt, ist ein direkter Vergleich kaum möglich. Das Ergebnis könnte jedoch darauf hindeuten, dass bei Zelllinien, die kein N-Cadherin besitzen, andere Faktoren, wie beispielsweise das von den BT-20 stark exprimierte VE-Cadherin, die Migration positiv beeinflussen können. Eine forcierte Expression von N-Cadherin in den BT-20 führt zu einer Steigerung des Migrationspotenzials, was bedeutet, dass N-Cadherin auch hier die Migration fördert (Nieman et al., 1999; Hazan et al., 2000).

5.6 N-Cadherin-Defizienz führt zu signifikant verringerter Invasion der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT

Der Einfluss der N-Cadherin-Defizienz auf das Invasionsverhalten der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT wurde mit einem auf dem Prinzip der Boyden-Chamber basierenden Zweikammersystem untersucht, bei dem die porige Membran zusätzlich mit Matrigel beschichtet worden war, um die extrazelluläre Matrix zu simulieren (siehe 3.2.9). Es zeigt sich, dass die N-Cadherin defizienten Klone im Vergleich zu den SUM149PT und den Scramble-Kontrollen ein hochsignifikant verringertes Invasionsverhalten aufweisen (siehe 4.5: Tabelle 9, Abbildung 19). Auch hier zeigt sich eine Ähnlichkeit zu Versuchen mit nur für VE-Cadherin herabregulierten Klonen der Zelllinie SUM149PT. Die VE-Cadherin defizienten Klone zeigten eine signifikant verringerte Invasion im Vergleich zu den Kontrollen (Schmidt, 2014).

Über welche Signalwege N- und VE-Cadherin auf die Invasion Einfluss nehmen, ist nicht vollständig geklärt. N-Cadherin kann zum Beispiel einen extrazellulären Komplex mit Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor(FGFR)-1 bilden. Eine Stabilisierung von FGFR-1 durch N-Cadherin in der Gegenwart von FGF-2 führt zu einer anhaltenden Aktivierung von Mitogen-activated protein kinase–Extracellular-signal regulated kinase (MAPK-ERK), was eine gesteigerte Transkription der Matrixmetalloproteinase(MMP)-9 nach sich zieht (Suyama et al., 2002). Eine erhöhte Expression der MMP-9 resultiert in einem gesteigerten Invasionspotenzial und ist vermehrt in Zellen zu finden, die den Prozess der EMT durchlaufen haben (Radisky, 2005). Hazan und Kollegen stellten fest, dass die mit N-

Cadherin transfizierte Brustkrebszelllinie MCF-7 *in vitro* eine höhere Invasivität zeigte, als Kontrollen ohne N-Cadherin. Erst nach Behandlung mit FGF-2 stieg jedoch der MMP-9-Spiegel und damit das Invasionspotenzial noch weiter an (Hazan et al., 2000). In einem Mausmodell war die N-Cadherin abhängige Lungenmetastasierung von der FGFR-Aktivierung, der ERK-Aktivität, einer gesteigerten MMP-9-Produktion und einer selektiven Inhibition von AKT-3 abhängig (Hulit et al., 2007; Qian et al., 2014). Labelle und Kollegen fanden heraus, dass auch bei Herabregulierung von VE-Cadherin in murinen Zellen die Expression von MMP-9 zurückging (Labelle, 2007). Es scheinen also sowohl N-, als auch VE-Cadherin einen Einfluss auf die Expression von MMP-9 und damit auf das zelluläre Invasionspotenzial zu haben.

Beim Vergleich der Invasion von BT-20 und SUM149PT zeigt sich kein signifikanter Unterschied, was bedeutet, dass die beiden Zelllinien ein ähnliches Invasionsverhalten aufweisen (siehe 4.5: Tabelle 9, Abbildung 19). Da es sich um zwei unterschiedliche Zelllinien handelt, ist eine direkte Schlussfolgerung schwer möglich. Das Ergebnis könnte jedoch darauf hindeuten, dass bei Zelllinien, die kein N-Cadherin besitzen, andere Faktoren, wie beispielsweise das von den BT-20 stark exprimierte VE-Cadherin, die Invasion beeinflussen können. Wird N-Cadherin in BT-20 forciert exprimiert, steigt auch das Invasionspotenzial der Zellen (Nieman et al., 1999; Hazan et al., 2000).

Die Herabregulierung von N-Cadherin resultiert also bei der humanen Brustkrebszelllinie SUM149PT in einer signifikanten Verringerung des Migrations- und Invasionspotenzials der Zellen. Die N-Cadherin-Defizienz führt hier auch zu einer drastischen Herabregulierung von VE-Cadherin. Versuche mit VE-Cadherin-Knock-down-Klonen zeigten ganz ähnliche Ergebnisse (Schmidt, 2014). Es ließe sich vermuten, dass N-Cadherin unter anderem über eine Regulation des VE-Cadherin auf Migration und Invasion humaner Brustkrebszellen einwirken kann. Die Tatsache, dass N-Cadherin bei der humanen Brustkrebszelllinie SUM149PT keinen Einfluss auf die Proliferation und die Sphäroidbildung hat, könnte darauf schließen lassen, dass N-Cadherin durch Stimulierung von Migration und Invasion eher beim Prozess des invasiven Wachstums und der Metastasierung eine Rolle spielt, als beim Tumorwachstum. Aleskandarany und Kollegen untersuchten an 1902 operablen primären invasiven Mammakarzinomen den Zusammenhang zwischen der Expression verschiedener Biomarker und dem Vorhandensein von Fernmetastasen. Dabei ist unter anderem eine hohe Expression von N-Cadherin mit einer frühen Entwicklung von Fernmetastasen assoziiert (Aleskandarany et al., 2015).

Zahlreiche Ergebnisse, einschließlich der in dieser Arbeit dargestellten, sprechen für eine tumorfördernde Wirkung von N-Cadherin, was dieses Molekül nicht nur zu einem neuen potenziellen prädiktiven Marker, sondern auch zu einem möglichen Therapieziel in der

Behandlung von Tumorpatienten macht. Es gibt verschiedene Typen von N-Cadherin-Antagonisten. Drei davon basieren auf einer Histidin-Alanin-Valin-Sequenz, die der sogenannten „cell adhesion recognition“(CAR)-Sequenz der ersten extrazellulären Domäne des N-Cadherin (EC1) entspricht: synthetische lineare Peptide, synthetische zyklische Peptide und nicht-peptidische Peptidomimetika (Hatta et al., 1988; Blaschuk, 2012; Brasch et al., 2012).

Das zyklische Peptid N-Acetyl-CysHisAlaValCys-NH₂ (ADH-1) ist einer der am besten untersuchten N-Cadherin-Antagonisten (Blaschuk & Devemy, 2009). ADH-1 kann die Angiogenese hemmen, sowie die Apoptose von Myelom-, Neuroblastom- und Pankreaskarzinomzellen anregen (Blaschuk et al., 2003; Shintani et al., 2008; Lammens et al., 2012; Sadler et al., 2013). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass ADH-1 das Pankreaskarzinom- und Melanomwachstum hemmt (Shintani et al., 2008). Die eingesetzte Dosis von ADH-1 hatte in den bisherigen Versuchen keine toxische Wirkung bei Tier und Mensch, was bedeuten könnte, dass dieser N-Cadherin-Antagonist die physiologische Vaskularisierung nicht beeinträchtigt (Augustine et al., 2008; Perotti et al., 2009; Blaschuk, 2015). Es gibt Hinweise dafür, dass ADH-1 zur Behandlung von Ovarialkarzinomen eingesetzt werden könnte (Perotti et al., 2009).

Eine weitere Möglichkeit der Antagonisierung des N-Cadherin stellen monoklonale Antikörper dar. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen die Ektodomäne von N-Cadherin resultierte bei einem Prostatakarzinommodell in einer Hemmung der lokalen Invasion und Metastasierung (Tanaka et al., 2010).

Qian und Kollegen untersuchten 99 menschliche Brusttumore auf die Koexpression von N-Cadherin mit HER2 und ER. Es zeigte sich, dass N-Cadherin häufig mit HER2 koexprimiert wird, aber auch in luminalen und tripelnegativen Mammakarzinomen zu finden ist (Qian et al., 2014).

Eine Anti-N-Cadherin-Therapie könnte auch bei BrustkrebspatientInnen, gerade mit tripelnegativen Mammakarzinomen, neue Möglichkeiten der Behandlung eröffnen.

6 Zusammenfassung

Trotz aller Fortschritte in Diagnostik und Behandlung bleibt die Therapie von BrustkrebspatientInnen – gerade bei tripelnegativen Mammakarzinomen, die nicht auf eine hormonelle Therapie ansprechen – eine Herausforderung. Eine wachsende Zahl von Belegen spricht dafür, dass Cadherine nicht nur in physiologischen Prozessen wie der Embryogenese, sondern auch in pathologischen Prozessen wie der Tumorprogression eine Rolle spielen, was diese Moleküle zu potenziellen Zielen einer targetspezifischen Tumorthherapie macht. Im Mausmodell konnte bislang gezeigt werden, dass eine Herabregulierung von N-Cadherin das Mammakarzinomwachstum *in vivo* hemmt. N-Cadherin wird auch in humanem Brustkrebsgewebe aberrant exprimiert. In nur schwach invasiven Brustkrebszelllinien führte eine Überexpression von N-Cadherin *in vitro* zu einer Steigerung des migratorischen und invasiven Verhaltens der Zellen.

In dieser Arbeit wurde an der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT der Einfluss einer Defizienz von N-Cadherin auf die Expression von E- und VE-Cadherin, sowie auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen *in vitro* untersucht.

Eine Charakterisierung der humanen Brustkrebszelllinien SUM149PT, der aus ihr hervorgegangenen mit shRNA transduzierten N-Cadherin-Knock-down-Klone und der Scramble-Kontrollen fand mittels Western Blot, RT-PCR, q-PCR und Immunfluoreszenzanalysen statt. Das Proliferationsverhalten der Zelllinien wurde mit Hilfe von Verdopplungszeitbestimmungen und Sphäroidversuchen analysiert. Um den Einfluss einer N-Cadherin-Defizienz auf die Migration zu untersuchen, wurden auf dem Prinzip der Boyden-Chamber basierende Versuche, sowie *in vitro* Wundheilungsversuche durchgeführt. Auch die Invasionsversuche basierten auf dem Prinzip der Boyden-Chamber. Eine zusätzliche Beschichtung mit Matrigel simulierte hier die extrazelluläre Matrix.

Bei den Untersuchungen mittels Western Blot, RT-PCR und q-PCR wurde deutlich, dass die N-Cadherin defizienten Klone keine Veränderung in der E-Cadherin-Expression, jedoch interessanterweise eine starke Herabregulierung von VE-Cadherin aufweisen. Bei den Immunfluoreszenzanalysen wiesen SUM149PT und Scramble-Kontrollen eine Expression von N-Cadherin in der Zellmembran auf, während die N-Cadherin-defizienten Klone keine N-Cadherin-Expression zeigten. Wie schon in Western-Blot, RT-PCR und q-PCR zeigten die N-Cadherin defizienten Klone im Vergleich zu den SUM149PT und den Scramble-Kontrollen keine veränderte E-Cadherin-Expression. Bei Einsatz eines VE-Cadherin-Antikörpers zeigten die N-Cadherin defizienten Klone keine Expression von VE-Cadherin, während SUM149PT und Scramble eine deutliche VE-Cadherin-Expression in der Zellmembran zeigten. Daraus

lässt sich schließen, dass N-Cadherin möglicherweise die Expression von VE-Cadherin beeinflussen kann.

In der Verdopplungszeitbestimmung ließen sich keine signifikanten Änderungen des Wachstumsverhaltens zwischen N-Cadherin defizienten Klonen und Kontrollzelllinien nachweisen. Um auch das dreidimensionale Wachstum der Zellen zu untersuchen, wurden Sphäroidversuche durchgeführt. Alle untersuchten Zelllinien bildeten stabile Sphäroide aus, die jedoch einen großen Saum an nicht integrierten Zellen aufwiesen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Sphäroidwachstum zwischen N-Cadherin defizienten Klonen und Kontrollzelllinien. Die Herabregulierung von N-Cadherin scheint in humanen Mammakarzinomzelllinien *in vitro* keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen zu haben.

Im Boyden-Chamber-Assay zeigte sich, dass eine Herabregulierung von N-Cadherin bei der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT *in vitro* zu einer signifikanten Verringerung des Migrationspotenzials führt. Dieses Ergebnis wurde beim *in vitro* Wundheilungsversuch bestätigt. Hier zeigten die N-Cadherin defizienten Klone eine signifikant verringerte Flächenbedeckungsrate – also eine signifikant verringerte Geschwindigkeit mit der die aufeinander zuwandernden Zellen eine freie Fläche bedecken – als die Kontrollzelllinien.

Im Invasionsversuch zeigten die N-Cadherin defizienten Klone im Vergleich zu den Kontrollen eine hochsignifikant verringerte Invasivität. Eine Herabregulierung von N-Cadherin bei der humanen Mammakarzinomzelllinie SUM149PT führt also *in vitro* zu einer signifikanten Verringerung des Invasionspotenzials.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass N-Cadherin bei humanen Mammakarzinomzelllinien durch seinen positiven Einfluss auf Migration und Invasion der Zellen eine große Rolle beim Prozess des invasiven Wachstums und der Metastasierung spielt.

Eine Anti-N-Cadherin-Therapie könnte auch bei BrustkrebspatientInnen, gerade mit tripelnegativen Mammakarzinomen, neue Möglichkeiten der Behandlung eröffnen.

Summary

Breast cancer is the most common cancer type for women and the most frequent type after lung cancer overall. In spite of all improvements in clinical diagnostics and treatment, the therapy of patients with breast cancer remains a difficult task. Therefore it is important to find new strategies of treatment, especially for patients with triple negative breast cancer that does not respond to hormone therapy. There is growing evidence that cadherins are not only important in physiological processes like embryogenesis but also in pathological processes like tumour progression. A so called cadherin switch has been implicated in carcinogenesis, in particular the loss of E-cadherin and the upregulation of N-cadherin. Thus, these molecules are an interesting subject of studies and a potential target for specific cancer therapy. It was shown previously that efficient silencing of N-cadherin in murine breast cancer cells inhibits tumour growth *in vivo*. N-cadherin is also aberrantly expressed in human breast cancer tissue. An overexpression of N-Cadherin in breast cancer cells enhances tumour cell motility, migration and invasion *in vitro*.

In this thesis the impact of N-cadherin deficiency on the expression level of E- and VE-cadherin as well as its effect on proliferation, migration and invasion behaviour of breast cancer cells *in vitro* was investigated.

The human breast cancer cell line SUM149PT, its N-cadherin deficient clones and scramble controls were characterised by Western Blot, RT-PCR, q-PCR and immunofluorescence staining. To analyse the impact of N-cadherin on the proliferation behaviour doubling time proliferation assays and spheroid assays were performed. A Boyden chamber assay and an *in vitro* wound healing assay were performed to investigate the effect of N-cadherin deficiency on cell migration. Furthermore, a Boyden chamber assay with a coating of Matrigel was used to study the invasion potential of the N-cadherin deficient cell clones and control cell lines.

The results of Western Blot, RT-PCR and q-PCR show that silencing of N-cadherin expression in SUM149PT cells had no influence on E-cadherin expression, but significantly decreased VE-cadherin expression. With immunofluorescence staining it was evidenced that SUM149PT and scramble controls express N-cadherin in the cell membrane, whereas N-cadherin deficient clones do not show any N-cadherin expression. There was no difference seen in E-cadherin expression between N-cadherin deficient clones and control cell lines. While SUM149PT and scramble controls expressed VE-cadherin in the cell membrane, N-cadherin deficient clones did not express VE-cadherin. These results suggest that N-cadherin may have an influence on the expression of VE-cadherin.

No significant alteration in proliferation behaviour between N-cadherin deficient clones and controls could be shown with the doubling time proliferation assay. To investigate the impact of N-cadherin on the three-dimensional growth spheroid assays were performed. All cell lines formed stable spheroids, however fringes of many not incorporated cells were found. There was no difference in spheroid growth between N-cadherin deficient clones and control cell lines. No influence of N-cadherin on cell proliferation *in vitro* could be seen.

With the help of Boyden chamber assays it was shown that silencing of N-cadherin in the human breast cancer cell line SUM149PT results in a significant decrease of migration potential *in vitro*. This was confirmed with an *in vitro* wound healing assay. N-cadherin deficient clones showed a significantly reduced surface coverage rate than SUM149PT and scramble controls.

A significant decrease of invasive cells in N-cadherin deficient clones in comparison to the controls was revealed in invasion assays. Thus silencing of N-Cadherin in the human breast cancer cell line SUM149PT leads to a significantly decreased invasion potential *in vitro*.

The results presented in this thesis provide evidence that N-cadherin is involved in invasive tumour progression and metastasis of the human breast cancer cell line SUM149PT by promoting cell migration and invasion.

Anti-N-cadherin strategies could thus be a potential target specific therapy of cancer patients, particularly with triple negative breast cancer.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Auftretens von EMT und MET in Tumorprogression und -metastasierung.	5
Abbildung 2: Vereinfachte Übersicht zur immunpathologischen Einteilung von Brustkrebs. .	10
Abbildung 3: Adhärenzkontakt mit Dimeren klassischer Cadherine	12
Abbildung 4: Aufbau des Western Blots	35
Abbildung 5: Beispiel einer Wachstumskurve zur Ermittlung der Verdopplungszeit	43
Abbildung 6: Schema des Migrationsversuches	44
Abbildung 7: Schema des <i>in vitro</i> Wundheilungsversuches	46
Abbildung 8: Schema des Invasionsversuches	47
Abbildung 9: Morphologie der verwendeten Zelllinien	52
Abbildung 10: Ergebnisse der RT-PCR	53
Abbildung 11: Ergebnisse der q-PCR	55
Abbildung 12: Ergebnisse des Western Blots.	56
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien BT-20 und SUM149PT	58
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung der Sum149PT/Scramble, sowie der N-Cadherin defizienten Klone Sh-N-cad-3/Sh-N-cad-12	60
Abbildung 15: Proliferationsverhalten	61
Abbildung 16: Beispielbilder von Sphäroiden an Tag 4 nach Aussaat (8000 Zellen/Well)	63
Abbildung 17: Migrationsverhalten	66
Abbildung 18: <i>in vitro</i> Wundheilungsverhalten	68
Abbildung 19: Invasionsverhalten	70

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Antikörper zur Durchführung des Western Blots	36
Tabelle 2: verwendete Primer mit DNA-Sequenzen.....	37
Tabelle 3: PCR-Programme	38
Tabelle 4: TaqMan® Sonden.....	39
Tabelle 5: verwendete Primär- und Sekundärantikörper bei der Immunfluoreszenzfärbung .	41
Tabelle 6: statistische Analyse des Proliferationsverhaltens	62
Tabelle 7: statistische Analyse des Migrationsverhaltens	65
Tabelle 8: statistische Analyse des Wundheilungsverhaltens	68
Tabelle 9: statistische Analyse des Invasionsverhaltens.....	69

9 Literaturverzeichnis

Abbott A. 2003. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 424: 870-2.

Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 119(6): 1438-49.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (Hrsg). 2011. *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Aufl. Verlag WILEY-VCH, Weinheim. S. 1280-1300.

Aleskandarany MA, Soria D, Green AR, Nolan C, Diez-Rodriguez M, Ellis IO, Rakha EA. 2015. Markers of progression in early-stage invasive breast cancer: a predictive immunohistochemical panel algorithm for distant recurrence risk stratification. *Breast Cancer Res Treat* 151(2): 325-33.

Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. 2005. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438: 946-53.

Arslan C, Sari E, Aksoy S, Altundag K. 2011. Variation in hormone receptor and HER-2 status between primary and metastatic breast cancer: review of the literature. *Expert Opin Ther Target* 15(1): 21-30.

Augustine CK, Yoshimoto Y, Gupta M, Zipfel PA, Selim MA, Febbo P, Pendergast AM, Peters WP, Tyler DS. 2008. Targeting N-cadherin enhances antitumor activity of cytotoxic therapies in melanoma treatment. *Cancer Res* 68: 3777-84.

Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. 2003. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21(10): 1973-9.

Bazzoni G, Dejana E. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84(3): 869-901.

Ben Ze'ev A, Geiger B. 1998. Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr Opin Cell Biol* (10): 629-39.

Berx G, van Roy F. 2001. The E-cadherin/catenin complex: an important gate keeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 3(5): 289-93.

-
- Berx G, van Roy F. 2009. Involvement of members in the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(6): a003129.
- Birchmeier W. 2005. Cell adhesion and signal transduction in cancer. Conference on cadherins, catenins and cancer. *EMBO Rep* 6: 413-7.
- Birchmeier W, Behrens J, Weidner KM, Hülken J, Birchmeier C. 1996. Epithelial differentiation and the control of metastasis in carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 213: 117-35.
- Bischoff J. 2015. Neue Therapieansätze beim Ovarialkarzinom. *Journal Onkologie* 2/2015: 103-4.
- Bixby JL, Zhang R. 1990. Purified N-cadherin is potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J Cell Biol* 110: 1253-60.
- Blanchard Z, Paul BT, Craft B, ElShamy WM. 2015. BRCA1-IRIS inactivation overcomes paclitaxel resistance in triple negative breast cancers. *Breast Cancer Res* 17(1): 5. (Epub ahead of print) DOI: 10.1186/s13058-014-0512-9.
- Blaschuk OW. 2012. Discovery and development of N-cadherin antagonists. *Cell Tissue Res* 348: 309-13.
- Blaschuk OW. 2015. N-cadherin antagonists as oncology therapeutics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (Epub ahead of print) DOI: 10.1098/rstb.2014.0039.
- Blaschuk OW, Devemy E. 2009. Cadherins as novel targets for anti-cancer therapy. *Eur J Pharmacol* 625(1-3): 195-8.
- Blaschuk OW, Gour BJ, Farookhi R, Anmar A. 2003. Compounds and methods for modulating endothelial cell adhesion. United States Patent Number 6,610,821.
- Blasco MA. 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6(8): 611-22.
- Bracke M, Roy FV, Mareel M. 1996. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. In: Gunthert U, Birchmeier W (Hrsg.) *Attempts to understand metastasis formation I. Metastasis-related molecules*. Springer, Berlin. S.: 123-61.
- Brasch J, Harrision OJ, Honig B, Shapiro L. 2012. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends Cell Biol* 22: 299-310.

- Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnurch H, Gotsch U, Vestweber D, Risau W, Dejana E. 1996. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* 87: 630-41.
- Breier G, Grosser M, Rezaei M. 2014. Endothelial cadherins in cancer. *Cell Tissue Res* 355: 523-7.
- Breier G, Risau W. 1996. The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol* 6: 454-456.
- Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura M, Navarro P, Golay J, Introna M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E. 1995. Functional properties of human vascular endothelial-cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1229-39.
- Cameron D, Brown J, Dent R, Jackisch C, Mackey J, Pivot X, Steger GG, Suter TM, Toi M, Parmar M, Laeufle R, Im YH, Romieu G, Harvey V, Lipatov O, Pienkowski T, Cottu P, Chan A, Im SA, Hall PS, Bubuteishvili-Pacaud L, Henschel V, Deurloo RJ, Pallaud C, Bell R. 2013. Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 14(10): 933-42.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moon L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98: 147-57.
- Cavallaro U, Christofori G. 2001. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta* 1552(1): 39-45.
- Cavallaro U, Christofori G. 2004a. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci*:1014: 58-66.
- Cavallaro U, Christofori G. 2004b. Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 118-132.
- Chen HC. 2005. Boyden chamber assay. *Methods Mol. Biol.* 294: 15-22.
- Chen QK, Lee K, Radisky DC, Nelson CM. 2013. Extracellular matrix proteins regulate epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Differentiation* 86(3): 126-32.

-
- Chen Z, Meng Z, Jia L, Cui R. 2014. The tumor microenvironment and cancer. *Biomed Res Int* (Epub ahead of print) DOI: 10.1155/2014/573947.
- Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. 2008. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* 6: 1521-1533.
- Chung S, Yao J, Suyama K, Bajaj S, Qian X, Loudig OD, Eugenin EA, Phillips GR, Hazan RB. 2013. N-cadherin regulates mammary tumor cell migration through Akt3 suppression. *Oncogene* 32(4): 422-30.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6(4): 443-6.
- Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, Breviario F, Lampugnani MG, Berenasconi S, Liao F, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E. 2002. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumorangiogenesis without sideeffects on endothelial permeability. *Blood* 100(3): 905-11.
- De Craene B, Berx G. 2013. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Rev Cancer* 13: 97-110.
- Dejana E. 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4): 261-70.
- Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. 1999. Vascular endothelial (VE) cadherin: only an intercellular glue?. *Ex Cell Rev* 252: 13-9.
- Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O, Bazzoni G. 2000. The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol* 44(6): 743-8.
- Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. 2008. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 121(Pt13): 2115-22.
- Deng CX. 2006. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res* 34(5): 1416-26.
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. 2007. Triple negative Breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 13: 4429-34.

Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, Harris CC, McLellan MD, Fulton RS, Fulton LL, Abbott RM, Hoog J, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Kalicki J, Zhang Q, Chen L, Lin L, Wendl MC, McMichael JF, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Appelbaum E, Deschryver K, Davies S, Guintoli T, Lin L, Crowder R, Tao Y, Snider JE, Smith SM, Dukes AF, Sanderson GE, Pohl CS, Delehaunty KD, Fronick CC, Pape KA, Reed JS, Robinson JS, Hodges JS, Schierding W, Dees ND, Shen D, Locke DP, Wiechert ME, Eldred JM, Peck JB, Oberkfell BJ, Lolofie JT, Du F, Hawkins AE, O'Laughlin MD, Bernard KE, Cunningham M, Elliott G, Mason MD, Thompson DM Jr, Ivanovich JL, Goodfellow PJ, Perou CM, Weinstock GM, Aft R, Watson M, Ley TJ, Wilson RK, Mardis ER. 2010. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* 464(7291): 999-1005.

Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123(5): 903-15.

Egeblad M, Werb Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2(3): 161-74.

Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, Ettl J, Patel R, Pinter T, Schmidt M, Shparyk Y, Thummala AR, Voytko NL, Fowst C, Huang X, Kim ST, Randolph S, Slamon DJ. 2015. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 16(1): 25-35.

Foty RA, Steinberg MS. 2004. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. *Int J Dev Biol* 48: 397-409.

Friedberg EC. 2003. DNA damage and repair. *Nature* 421: 436-440.

Friedl P, Wolf K. 2010. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 188(1): 11-9.

Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart L. 2009. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols* 4(3): 309-24.

Fry SA, Sinclair J, Timms JF, Leatham AJ, Dwek MV. 2013. A targeted glycoproteomic approach identifies cadherin-5 as a novel biomarker of metastatic breast cancer. *Cancer Lett* 28; 328(2): 335-44.

Garcia de Herreros A. 2014. Epithelial to mesenchymal transition in tumor cells as consequence of phenotypic instability. *Front Cell Dev Biol* 12 (2): 71.

- Garon EB, Ciuleanu TE, Arrieta O, Prabhash K, Syrigos KN, Goksel T, Park K, Gorbunova V, Kowalyszyn RD, Pikiel J, Czyzewicz G, Orlov SV, Lewanski CR, Thomas M, Bidoli P, Dakhil S, Gans S, Kim JH, Grigorescu A, Karaseva N, Reck M, Cappuzzo F, Alexandris E, Sashegyi A, Yurasov S, Pérol M. 2014. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for secondline treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): A multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet* 384(9944): 665–673.
- Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C, Kraft A. 1997. Angiogenesis as a target for tumor treatment. *Oncology* 54(3): 177-184.
- Geho DH, Bandle RW, Clair T, Liotta LA. 2005. Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology (Bethesda)* 20: 194-200.
- Gerber B, Loibl S, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, Eggemann H, Schrader I, Kittel K, Hanusch C, Kreienberg R, Solbach C, Jackisch C, Kunz G, Blohmer JU, Huober J, Hauschild M, Nekljudova V, Untch M, von Minckwitz G. 2013. Neoadjuvant bevacizumab and anthracycline-taxane-based chemotherapy in 678 triple-negative primary breast cancers; results from the geparquinto study (GBG 44). *Ann Oncol* 24(12): 2978-84.
- Giampietro C, Taddei A, Corada M, Sarra-Ferraris GM, Alcalay M, Cavallaro U, Orsenigo F, Lampugnani MG, Dejana E. 2012. Overlapping and divergent signaling pathways of N-cadherin and VE-cadherin in endothelial cells. *Blood* 119(9): 2159-70.
- Giannotta M, Trani M, Dejana E. 2013. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell* 26: 441-54.
- Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P, Foidart JM. 2003. Transactivation of vimentin by β -catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res*: 2658-64.
- Gumbiner BM. 2000. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 148(3): 399-404.
- Gumbiner BM. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8): 622-34.
- Haeger A, Krause M, Wolf K, Friedl P. 2014. Cell jamming: collective invasion of mesenchymal tumor cells imposed by tissue confinement. *Biochim Biophys Acta*: 2386-95.
- Hanahan D, Folkmann J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86(3): 353-364.

-
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-74.
- Hatta K, Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. 1988. Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity and the cadherin gene family. *J Cell Biol* 106: 873-81.
- Hay ED. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154: 8-20.
- Hayflick L. 1997. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry* 62: 1180-90.
- Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI. 1997. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun* 4: 399-411.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. 2000. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion and metastasis. *J Cell Biol* 148(4): 779-90.
- Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. 2004. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 1014: 155-63.
- Hedderich J, Sachs L. 2012. *Angewandte Statistik*. 14. Auflage, Springer, Berlin, S.78-79, 80-82, 470-473.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, Schatteman GC, Seftor RE. 2001. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(14): 8018-23.
- Higgins MJ, Baselga J. 2011. Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest* 121(10): 3797-803.
- Hoffmeyer MR, Wall KM, Dharmawardhane SF. 2005. In vitro analysis of the invasive phenotype of SUM 149, an inflammatory breast cancer cell line. *Cancer Cell Int* 27; 5(1): 11.
- Hollestelle A, Nagel JH, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M, Ng SS, French PJ, Peeters JK, Rozendaal MJ, Riaz M, Koopmann DG, Ten Hagen TL, de Leeuw BH, Zwarthoff EC, Teunisse A, van der Spek PJ, Kleijn JG, Dinjens WN, Ethier SP, Clevers H, Jochemsen AG, den Bakker MA, Foekens JA, Martens JW, Schutte M. 2010. Distinct gene mutation

profiles among luminal-type and basal-like breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 121(1): 53-64.

Hollestelle A, Peeters JK, Smid M, Timmermans M, Verhoog LC, Westenend PJ, Heine AA, Chan A, Sieuwerts AM, Wiemer EA, Klijn JG, van der Spek PJ, Foekens JA, Schutte M, den Bakker MA, Martens JW. 2013. Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 138(1): 47-57.

Holsinger LJ, Ward K, Duffield B, Zachwieja J, Jallal B. 2002. The transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase DEP1 interacts with p120^{ctn}. *Oncogene* 21(46): 7067-76.

Holst F, Stahl RR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, Lebeau A, Terracciano L, Al-Kuraya K, Jänicke F, Sauter F, Simon R. 2007. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet* 39(5): 655-60.

Holzapfel B, Wickert L. 2007. Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). *Biol. unserer Zeit*. 37: 120-126.

Horst D, Budczies J, Brabletz T, Kirchner T, Hlubek F. 2009. Invasion associated up-regulation of nuclear factor kappaB target genes in colorectal cancer. *Cancer* 115: 4946-58.

Huber P, Mallet C, Faure E, Rampon C, Prandini MH, Feraud O, Bouillot S, Vilgrain I. 2005. ACTH depletion represses vascular endothelial-cadherin transcription in mouse adrenal endothelium in vivo. *J Mol Endocrinol* 34: 127-37.

Hug H. 2000. Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biol. unserer Zeit* 30: 128-135.

Hulit J, Suyama K, Chung S, Keren R, Agiostratidou G, Shan W, Dong X, Williams TM, Lisanti MP, Knudsen K, Hazan RB. 2007. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res*: 3106-16.

Ignatoski KM, Ethier SP. 1999. Constitutive activation of pp125fak in newly isolated human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treatment* 54: 173-182.

Iurlaro R, León-Annicchiarico CL, Muñoz-Pinedo C. 2014. Regulation of cancer metabolism by oncogenes and tumor suppressors. *Methods Enzymol* 542: 59-80.

Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, Baba H, Mori M. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 101: 293-9.

-
- Jacob A, Prekeris R. 2015. The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *Front Cell Dev Biol* (Epub ahead of print) DOI: 10.3389/fcell.2015.00004.
- Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, Janda E, Lüdemann S, Waerner T, Seither P, Weith A, Beug H, Kraut N. 2003. Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene* 22(46): 7155-69.
- Jordan VC, Brodie AM. 2007. Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids* 72(1): 7-25.
- Karn T, Rody A, Ruckhäberle E, Gätje R, Kaufmann M. 2010. Brustkrebs: auf dem Weg zu einer personalisierten Therapie. *Forschung Frankfurt* 2: 32-6.
- Kast K, Rhiem K. 2015. Familial breast cancer - targeted therapy in secondary and tertiary prevention. *Breast Care (Basel)* 10(1): 27-31.
- Keller PJ, Lin AF, Arendt LM, Klebba I, Jones AD, Rudnick JA, DiMeo TA, Gilmore H, Jefferson DM, Graham RA, Naber SP, Schnitt S, Kuperwasser C. 2010. Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines. *Breast Cancer Res* 12(5): R87.
- Kemler R. 1993. From cadherins to catenins: cytoplasmatic protein interaction and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 9(9): 317-21.
- Kiener HP, Brenner MP. 2005. Building the synovium: cadherin-11 mediates fibroblast-like synoviocyte cell-to-cell adhesion. *Arthritis Res Ther* 7: 49-54.
- Kim W, Kim M; Jho EH. 2013. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J* 450(1): 9-21.
- Klymkowsky MW. 2005. Beta-catenin and its regulatory network. *Hum Pathol* 36: 225-7.
- Klymkowsky MW, Parr B. 1995. The body language of cells: the intimate connection between cell adhesion and behavior. *Cell* 83: 5-8.
- Koo TH, Lee JJ, Kim EM, Kim KW, Kim HD, Lee JH. 2002. Syntenin is overexpressed and promotes cell migration in metastatic human breast and gastric cancer cell lines. *Oncogene* 21: 4080-8.
- Kumar A, Gupta T, Berzsenyi S, Giangrande A. 2015. N-cadherin negatively regulates collective Drosophila glial migration via actin cytoskeleton remodeling. *J Cell Sci* (Epub ahead of print) DOI: 10.1242/jcs.157974.

-
- Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. 2004. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* (4): 273-85.
- Labelle M. 2007. Role of the aberrantly expressed vascular endothelial-cadherin in aggressive breast tumor cells. Technische Universität, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften Dresden, Dissertationsschrift (Dr. rer. nat.).
- Labelle M, Schnittler HJ, Aust DE, Friedrich K, Baretton G, Vestweber D, Breier G. 2008. Vascular endothelial cadherin promotes breast cancer progression via transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res* 68(5): 1388-97.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85.
- Lammens T, Swerts K, Derycke L, De Craemer A, De Brouwer S, De Preter K, Van Roy N, Vandesompele J, Speleman F, Philippé J, Benoit Y, Beiske K, Bracke M, Laureys G. 2012. N-cadherin in neuroblastoma disease: expression and clinical significance. *PLoS One* 7(2): e31206. DOI: 10.1371/journal.pone.0031206.
- Lasfargues EY, Ozello L. 1958. Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 21(6): 1131-1147.
- Law ME, Corsino PE, Narayan S, Law BK. 2015. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Anticancer Therapeutics. *Mol Pharmacol* (Epub ahead of print) pii: mol.115.099325.
- Lee C, Lee C, Atakilit A, Siu A, Ramos DM. 2014. Differential spheroid formation by oral cancer cells. *Anticancer Res* 34(12): 6945-9.
- Lee EY, Muller WJ. 2010. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: a003236.
- Lee HB, Han W. 2014. Unique features of young age breast cancer and its management. *J Breast Cancer* 17(4): 301-7.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development and disease. *J Cell Biol* 172(7): 973-81.
- Le Guelte A, Dwyer J, Gavard J. 2011. Jumping the barrier: VE-cadherin, VEGF and other angiogenic modifiers in cancer. *Biol Cell* 103(12): 593-605.
- Li CI, Uribe DJ, Daling JR. 2005. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 93(9): 1046-52.

-
- Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamnes GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. 2008. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 100: 672-9.
- Liao F, Li Y, O'Connor W, Zanetta L, Bassi R, Santiago A, Overholser J, Hooper A, Mignatti P, Dejana E, Hicklin DJ, Bohlen P. 2000. Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Cancer Res* 60(24): 6805-10.
- Lindsey S, Langhans SA. 2014. Crosstalk of oncogenic signaling pathways during epithelial-mesenchymal transition. *Front Oncol* 4 (358): 1-10.
- Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. 1974. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 34(5): 997-1004.
- Liu H, Li X, Dong C. 2015. Epigenetic and metabolic regulation of breast cancer stem cells. *Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 16(1): 10-7.
- Lüdders DW. 2014. Targeted therapy beim triple-negativen Mammkarzinom. *Gyn* 19: 95-104.
- Luo Y, Radice GL. 2005. N-Cadherin acts upstream of VE-Cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 169: 29-34.
- Lux MP, Fasching PA, Beckmann MW. 2006. Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *J Mol Med (Berl.)* 84(1):16-28.
- Maciejczyk A. 2013. New prognostic factors in breast cancer. *Adv Clin Exp Med* 22: 5-15.
- Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. 2009. Oncolytic reovirus effectively targets breast cancer stem cells. *Mol Ther* 17: 972-9.
- Mariotti A, Perotti A, Sessa C, Rugg C. 2007. N-cadherin as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 16: 451-65.
- Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. 2010. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol* 7: 693-701.
- Mehta D, Malik AB. 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 86(1): 279-367.
- Meng W, Takeichi M. 2009. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(6): 1002899.

- Merino D, Malkin D. 2014. p53 and hereditary cancer. *Subcell Biochem* 85: 1-16.
- Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15: 117-34.
- Mjaatvedt CH, Markwald RR. 1989. Induction of an epithelial-mesenchymal transition by an in vivo adheron-like complex. *Dev Biol* 136(1): 118-28.
- Momeny M, Saunus JM, Marturana F, McCart Reed AE, Black D, Sala G, Iacobelli S, Holland JD, Yu D, Da Silva L, Simpson PT, Khanna KK, Chenevix-Trench G, Lakhani SR. 2014. Heregulin-HER3-HER2 signaling promotes matrix metalloproteinase-dependent blood-brain-barrier transendothelial migration of human breast cancer cell lines. *Oncotarget* 6: 3932-46.
- Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. 1996. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380: 360-4.
- Nagi C., Guttman M., Jaffer S., Qiao R., Keren R., Triana A, Li M., Godbold J., Bleiweiss IJ., Hazan RB. 2005. N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant-invasive micropapillary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 94: 225-35.
- Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, Cook K, Stepansky A, Levy D, Esposito D, Muthuswamy L, Krasnitz A, McCombie WR, Hicks J, Wigler M. 2011. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 472(7341):90-4.
- Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, Cook K, Meth J, Kendall J, Riggs M, Eberling Y, Troge J, Grubor V, Levy D, Lundin P, Månér S, Zetterberg A, Hicks J, Wigler M. 2010. Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome Res* 20(1): 68-80.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. 1999. N-Cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 147: 631-44.
- Nishimura R, Arima N. 2008. Is triple negative a prognostic factor in breast cancer?. *Breast Cancer* 15(4): 303-8.
- Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, Poole C, Mathijssen RH, Sonke GS, Colombo N, Špaček J, Vuylsteke P, Hirte H, Mahner S, Plante M, Schmalfeldt B, Mackay H, Rowbottom J, Lowe ES, Dougherty B, Barrett JC, Friedlander M. 2015. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 16(1): 87-97.

- Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. 1990. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4246-50.
- Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. 2009. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J* 15(6): 593-602.
- Parker BS, Argani P, Cook BP, Liangfeng H, Chartrand SD, Zhang M, Saha S, Bardelli A, Jiang Y, St Martin TB, Nacht M, Teicher BA, Klinger KW, Sukumar S, Madden SL. 2004. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 64(21): 7857-66.
- Patel RR, Sharma CG, Jordan VC. 2007. Optimizing the antihormonal treatment and prevention of breast cancer. *Breast Cancer* 14(2): 113-22.
- Patel SD, Ciatto C, Chen CP, Bhana F, Rajebhosale M, Arkus N, Schieren I, Jessel TM, Honig B, Price SR, Shapiro L. 2006. Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* 124: 1255-68.
- Peddi PF, Ellis MJ, Ma C. 2012. Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy. *Int J Breast Cancer*. DOI: 10.1155/2012/217185.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nat Rev Cancer* 7: 415-28.
- Perotti A, Sessa C, Mancuso A, Noberasco C, Cresta S, Locatelli A, Carcangiu ML, Passera K, Braghetti A, Scaramuzza D, Zanaboni F, Fasolo A, Capri G, Miani M, Peters WP, Gianni L. 2009. Clinical and pharmacological phase I evaluation of Exherin (ADH-1), a selective anti-N-cadherin peptide in patients with N-cadherin-expressing solid tumours. *Ann Oncol* 20: 741-5.
- Perou CM, Berreson-Dale AL. 2011. Systems, biology and genomics of breast cancer. *Col Spring Harb Perspect Biol* 3(2).
- Pfaffl MW. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*. 1/04: 92-95.
- Pinder SE, Ellis IO. 2003. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: ductal carcinoma *in situ* (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH): current definitions and classifications. *Cancer Res* 5(5): 254-7.

- Polyak K. 2011. Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest* 121(10): 3786-8.
- Polyak K. 2014. Tumor Heterogeneity Confounds and Illuminates: A case for Darwinian tumor evolution. *Nature Med* 20: 344-346.
- Porter PL. 2009. Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Publica Mex* 51(2): 141-6.
- Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. 2014. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 16(6): 488-94.
- Qian X, Anzovino A, Kim S, Suyama K, Yao J, Hulit J, Agiostratidou G, Chandiramani N, McDaid HM, Nagi C, Cohen HW, Phillips GR, Norton L, Hazan RB. 2014. N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. *Oncogene* 33(26): 3411-21.
- Radisky DC. 2005. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 118: 4325-6.
- Rafael D, Doktorovová S, Florindo HF, Gener P, Abasolo I, Schwartz S, Videira MA. 2015. EMT Blockage Strategies: Targeting Akt Dependent Mechanisms for Breast Cancer Metastatic Behaviour Modulation. *Curr Gene Ther.*(Epub ahead of print) PMID: 25619882.
- Reymond N, d'Água BB, Ridley AJ. 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* 13(12): 858-70.
- Rezaei M. 2011. Interplay between N-cadherin and VE-cadherin in breast cancer progression. Technische Universität; medizinische Fakultät Dresden, Dissertationsschrift (Dr. rer. medic.).
- Rezaei M, Friedrich K, Wielockx B, Kuzmanov A, Kettelhake A, Labelle M, Schnittler H, Baretton G, Breier G. 2012. Interplay between neural-cadherin and vascular-endothelial-cadherin in breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 14: R154.
- Rieger-Christ KM, Lee P, Zagha R, Kosakowski M, Moinzadeh A, Stoffel J, Ben-Ze'ev A, Libertino JA, Summerhayes IC. 2004. Novel expression of N-Cadherin elicits in vitro bladder cell invasion via the Akt signaling pathway. *Oncogene* 23: 4745-53.
- Rimawi MF, Schiff R, Osborne CK. 2015. Targeting HER2 for the Treatment of Breast Cancer. *Annu Rev Med* 66: 111-28. DOI: 10.1146/annurev-med-042513-015127.
- Sachs L. 1974. *Angewandte Statistik*. 4. Auflage, Springer, Berlin. S. 130-7, 352-9.

-
- Sadler NM, Harris BR, Metzger BA, Kirshner J. 2013. N-cadherin impedes proliferation of the multiple myeloma cancer stem cells. *Am J Blood Res* 18; 3(4): 271-85.
- Salomon D, Ayalon O, Patel-King R, Hynes RO, Geiger B. 1992. Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J Cell Sci* 102: 7-17.
- Sanchez-Heras E, Howell FV, Williams G, Doherty P. 2006. The fibroblast growth factor receptor acid box is essential for interaction with N-Cadherin and all of the major isoforms of neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 281: 35208-16.
- Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, Bruton R, Marsden JR, Jankowski J. 1999. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol* 52: 151-7.
- Sandig M, Voura EB, Kalnins VI, Siu C. 1997. Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. *Cell Motility Cytoskeleton* 38: 351-64.
- Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH.. 2006. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for nonsmall cell lung cancer. *N Engl J Med* 355(24): 2542–2550.
- Schmidt A. 2014. The impact of VE-cadherin on breast cancer cell behavior. Brandenburgische Technische Universität Cottbus-Senftenberg, Master thesis (M.Sc.) (Unveröffentlichte Arbeit).
- Schmidt H, Rothhämel S. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). 2012. In: Jahnsen M, Rothhämel S (Hrsg) *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. erw. Aufl., Springer, Berlin, S. 135-142.
- Schön S, Flierman I, Ofner A, Stahringer A, Holdt LM, Kolligs FT, Herbst A. 2014. β -catenin regulates NF- κ B activity via TNFRSF19 in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 15; 135(8): 1800-11.
- Shay JW, Wright WE. 2000. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 72-6.
- Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, Wheelock MJ, Johnson KR. 2008. ADH-1 suppresses N-cadherin-dependent pancreatic cancer progression. *Int J Cancer* 122(1): 71-7.
- Smith KL, Isaacs C. 2011. BRCA mutation testing in determining breast cancer therapy. *Cancer J* 17(6):492-9.

-
- Somlo G, Lau SK, Frankel P, Hsieh HB, Liu X, Yang L, Krivacic R, Bruce RH. 2011. Multiple biomarker expression on circulating tumor cells in comparison to tumor tissues from primary and metastatic sites in patients with locally advanced/inflammatory, and stage IV breast cancer, using a novel detection technology. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 128(1): 155-163.
- Song H, Xu Y. 2007. Gain of function of p53 cancer mutants in disrupting critical DNA damage response pathways. *Cell Cycle* 6: 1570-3.
- Sotiriou C, Pusztai L. 2009. Gene expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 360(8): 790-800.
- Stähler E, Kübler U. 2013. Welche neuen Erkenntnisse sind bei der Therapie von Brustkrebs-Patientinnen zu berücksichtigen? *Privatarzt Gyn* 4: 6-10.
- Stendahl M, Ryden L, Nordenskjold B, Jonsson BE, Landberg G, Jirstrom K. 2006. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 12 (15): 4614-8.
- Stepniak E, Radice GL, Vasioukhin V. 2009. Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a002949.
- Stewart DA, Yang Y, Makowski L, Troester MA. 2012. Basal-like breast cancer cells induce phenotypic and genomic changes in macrophages. *Mol Cancer Res* 10(6): 727-38.
- Stoletov K, Kato H, Zardousian E, Kelber J, Yang J, Shattil S, Klemke R. 2010. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J Cell Sci* 10(6): 727-38.
- Stotter A, Walker R. 2010. Tumour markers predictive of successful treatment of breast cancer with primary endocrine therapy in patients over 70 years old: a prospective study. *Crit Rev Oncol Hematol* 75(3): 249-56.
- Su Y, Li J, Witkiewicz AK, Brennan D, Neill T, Talarico J, Radice GL. 2012. N-cadherin haploinsufficiency increases survival in a mouse model of pancreatic cancer. *Oncogene* 31(41): 4484-9.
- Sun Y. 2015. Translational horizons in the tumor microenvironment: Harnessing breakthroughs and targeting cures. *Med Res Rev.* (Epub ahead of print) DOI: 10.1002/med.21338
- Suyama K, Shapiro I, Guttman M, Hazan RB. 2002. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell* 2(4): 301-14.

-
- Takeichi M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251(5000): 1451-5.
- Takeichi M. 2011. Self-organization of animal tissues: cadherin-mediated processes. *Dev Cell* 21(1): 24-6.
- Tanaka H, Kono E, Tran CP, Miyazaki H, Yamashiro J, Shimomura T, Fazli L, Wada R, Huang J, Vessella RL, An J, Horvath S, Gleave M, Rettig MB, Wainberg ZA, Reiter RE. 2010. Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat Med* 16(12): 1414-20.
- Tanaka H, Shan W, Phillips GR, Arndt K, Bozdagi O, Shapiro L, Huntley GW, Benson DL, Colman DR. 2000. Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron* 25: 93-107.
- Telli ML, Sledge GW. 2015. The future of breast cancer systemic therapy: the next 10 years. *J Mol Med (Berl.)* (Epub ahead of print) DOI: 10.1007/s00109-014-1238-y.
- Thiery JP. 2002. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2(6): 442-54.
- Thiery JP. 2003. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15(6): 740-6.
- Thiery JP, Aclouque H, Huang RY, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139(5): 871-90.
- Thompson EW, Torri J, Sabol M, Sommers CL, Byers S, Valverius EM, Martin GR, Lippmann ME, Stampfer MR, Dickson RB. 1994. Oncogene-induced basement membrane invasiveness in human mammary epithelial cells. *Clin Exp Metastasis* 12(3): 181-94.
- Tillet E, Vittet D, Feraud O, Moore R, Kemler R, Huber P. 2005. N-cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis. *Exp Cell Res* 310: 392-400.
- Tomaskovic-Crook E, Thompson EW, Thiery JP. 2009. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Res* 11(6): 213.
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ, Schalken JA. 2000. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 60: 3650-4.

-
- Van Roy F. 2014. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nature* 14: 121-34.
- Vestweber D. 2008. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(2): 223-32.
- Vogelstein B, Kinzler KW. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature* 10(8): 789-99.
- Vonach C, Viola K, Giessrigl B, Huttary N, Raab I, Kalt R, Krieger S, Vo TPN, Madlener S, Bauer S, Marian B, Hämmerle M, Kretschy N, Teichmann M, Hantusch B, Stary S, Unger C, Seelinger M, Eger A, Mader R, Jäger W, Schmidt W, Grusch M, Dolznig H, Mikulits W, Krupitza G. 2011. NF- κ B mediates the 12(S)-HETE-induced endothelial to mesenchymal transition of lymphendothelial cells during the intravasation of breast carcinoma cells. *Cancer Res* 105: 263-71.
- Wagener C, Müller O. 2010. *Molekulare Onkologie; Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3. erw. Aufl. Thieme, Stuttgart, S. 243-50, 293-7.
- Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. 2010. Histological types of breast cancer: how special are they?. *Mol Oncol* 4(3): 192-208.
- Weinberg RA. 2014. *The biology of cancer*. 2. Aufl., Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Wheelock MJ, Soler AP, Knudsen KA. 2001. Cadherin junctions in mammary tumors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6(3): 275-85.
- Wheelock MJ, Johnson KR. 2003. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 207-35.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vamce GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF. 2007. American Society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. 2007. *Arch Pathol Lab Med* 131(1): 18-43.
- Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS, Segall JE. 2000. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* 60(9): 2504-11.

-
- Yamaguchi H, Condeelis J. 2007. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 1773(5): 642-52.
- Yanai A, Inoue N, Yagi T, Nishimukai A, Miyagawa Y, Murase K, Imamura M, Enomoto Y, Takatsuka Y, Watanabe T, Hirota S, Sasa M, Katagiri T, Miyoshi Y. 2014. Activation of mTOR/S6K But Not MAPK Pathways Might Be Associated With High Ki-67, ER+, and HER2-Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. (Epub ahead of print) DOI: 10.1016/j.clbc.2014.12.002.
- Yilmaz M, Christofori G. 2009. EMT, the cytoskeleton and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28: 15–33.
- Yip CH, Smith RA, Anderson BO, Miller AB, Thomas DB, Ang ES, Caffarella RS, Corbex M, Kreps GL, McTiernan A. 2008. Breast health global initiative early detection panel. Guideline implementation for breast healthcare in low- and middle-income countries: early detection resource allocation. *Cancer* 113(8): 2244-56.
- Zeisberg M, Neilson EG. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119: 1429-37.
- Zen K, Liu DQ, Guo YL, Wang C, Shan J, Fang M, Zhang CY, Liu Y. 2008. CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. *PLoS One* 3(3): e1826.
- Zhang LZ, Mei J, Qian ZK, Cai XS, Jiang Y, Huang WD. 2010. The role of VE-Cadherin in osteosarcoma cells. *Pathol Oncol Res* 16(1): 111-7.
- Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. 2000. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol* 20(12): 4238-52.

10 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Georg Breier für die umfassende und fachkundige Betreuung. Ich weiß es sehr zu schätzen, dass er sich stets so viel Zeit für all meine Fragen und Anliegen nahm.

Für die Co-Betreuung meiner Arbeit im Rahmen des Else Kröner-Promotionskollegs danke ich Frau Prof. Dr. Leoni Kunz-Schughart und Herrn Prof. Dr. Henning Morawietz. Der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kunz-Schughart im OncoRay Dresden, im Besonderen Frau Melanie Hüther, danke ich für die freundliche und geduldige Betreuung der Sphäroidversuche.

Frau Dr. Marianne Großer möchte ich für die Geduld und Kompetenz bei der Begleitung während des ganzen Prozesses der Entstehung der Arbeit danken; für die Hilfe im Labor, die fachliche Beratung und die Durchsicht meiner Arbeit. Des Weiteren danke ich Frau Anke Klawitter und Frau Dr. Marianne Grosser für das Zurverfügungstellen der Knockdown-Klone. Ganz herzlich danke ich Frau Antje Schmidt für die zeitintensive Einarbeitung in die Labormethoden und die erheiternden und allgemeinbildungsfördernden Pausen zwischendurch.

Frau Annelie Zürich und Frau Annegret Proschmann standen mir jeder Zeit bei all meinen Fragen und mit helfenden Händen zur Seite. Für ihre fröhliche Liebenswürdigkeit und beständige Hilfe möchte ich mich herzlich bedanken.

Fachliche und moralische Unterstützung erhielt ich stets auch von der Arbeitsgruppe PD Dr. Muters. Vielen lieben Dank im Besonderen an Frau Pia Hönscheid und Herrn Samuel Schellenburg für motivierende Gespräche im Labor oder bei Bier und Pferderückenglück.

Ich danke dem Else Kröner-Promotionskolleg für die finanzielle und ideelle Förderung, sowie Frau Corinna Oswald für ihr aufmerksames und zuverlässiges Organisationstalent.

Mein tiefer Dank gilt Frau Dr. Regina Kienel, Herrn Reinhold Riedel und Herrn Stefan Steude, ohne die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Anlage 1

Technische Universität Dresden

Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus

Promotionsordnung vom 24. Juli 2011

Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:
Prof. Dr. Georg Breier

3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht:

Vortrag „Die Rolle des N-Cadherin im Mammakarzinom“ im Rahmen des Workshops des Else Kröner-Promotionskollegs, 26.–28. März 2015, Dresden

6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.

7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.

8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Dresden, den

Unterschrift des Doktoranden _____

Anlage 2

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen
entfällt

die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes
entfällt

die Einhaltung des Gentechnikgesetzes
Aktenzeichen: Az. 55-8811.72/69

die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden, den

Unterschrift des Doktoranden _____