

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zelluläre Mechanismen der Fulvestrant-induzierten Reorganisation von Adherens Junctions in  
Brustkrebszellen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jakob Tobias Zell  
geboren in Saarbrücken

Datum der Promotion: 04.03.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>LISTE DER ABBILDUNGEN .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DER TABELLEN .....</b>	<b>5</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>6</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
2.1. MAMMAKARZINOME: EIN ÜBERBLICK.....	10
2.1.1. <i>Histologische Subtypen der Mammakarzinome</i> .....	10
2.1.2. <i>Zelluläre Marker für die Typisierung von Mammakarzinomen</i> .....	10
2.1.3. <i>Antiöstrogene Therapie von Mammakarzinomen</i> .....	12
2.2. ADHERENS JUNCTIONS.....	12
2.2.1. <i>E-Cadherine an der Adherens Junction</i> .....	13
2.2.2. <i>Zytoskelettale Organisation von Adherens Junctions</i> .....	13
2.2.3. <i>Adherens Junctions: Regulation und Metastasierung</i> .....	14
2.3. DIE REGULATION VON ADHERENS JUNCTIONS ALS EFFEKTOR ZIELGERICHTETER TUMORTHERAPIEN .....	14
2.4. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT .....	15
<b>3. MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>17</b>
3.1. MATERIALIEN .....	17
3.1.1. <i>Geräte</i> .....	17
3.1.2. <i>Chemikalien, Puffer und Lösungen</i> .....	18
3.1.3. <i>Zellkulturreagenzien und Chemikalien</i> .....	20
3.1.4. <i>Zelllinien</i> .....	21
3.1.5. <i>Antikörper</i> .....	21
3.1.6. <i>Plasmide</i> .....	22
3.1.7. <i>Oligonukleotide</i> .....	22
3.1.8. <i>Kits</i> .....	23
3.1.9. <i>Allgemeine Materialien und Reagenzien</i> .....	24
3.2. METHODEN .....	25
3.2.1. <i>Zellkultur</i> .....	25
3.2.2. <i>Transfektion</i> .....	26
3.2.3. <i>Immunofluoreszenz</i> .....	26
3.2.4. <i>Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) und quantitative real-time PCR (qPCR)</i> .....	27
3.2.5. <i>Proteinextraktion, Gelelektrophorese, Western Blot und Coomassie-Färbung</i> .....	28
3.2.6. <i>siRNA Knockdown</i> .....	30

3.2.7. <i>Motilitätsassessment von Membranstrukturen</i> .....	31
3.2.8. <i>RhoA-Aktivitätsassay</i> .....	31
3.2.9. <i>Bioinformatische und statistische Methoden</i> .....	31
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>32</b>
4.1. E-CADHERIN STABILISIERT DIE FULVESTRANT-INDUZIERTER REORGANISATION VON AJS IN MCF-7/vBOS ZELLEN .....	32
4.2. FULVESTRANT INDUZIERT DIE SPEZIFISCHE ASSOZIATION VON RHOA UND RRAS2 MIT E-CADHERIN .....	35
4.3. DAS VORHANDENSEIN VON RHOA, NICHT ABER VON RRAS2, IST NÖTIG FÜR DIE AUSPRÄGUNG FULVESTRANT-INDUZIERTER REORGANISATION VON ADHERENS JUNCTIONS .....	38
4.4. DIE SPEZIFISCHE HEMMUNG DER GEF-BINDEDOMÄNE VON RHOA INDUZIERT DER REORGANISATION VON ADHERENS JUNCTIONS ÄHNLICHE MORPHOLOGISCHE EFFEKTE .....	41
<b>5. DISKUSSION</b> .....	<b>49</b>
5.1. ERA, E-CADHERIN UND ADHERENS JUNCTIONS.....	49
5.2. E-CADHERIN UND RHOA: ZYTOSKELETTREGULATION UND ZELL-ZELL-ADHÄSION.....	54
5.3. DIE DIFFERENZIERTER AKTIVITÄT VON RHO-GTPASEN AN ADHÄSIONSKONTAKTEN .....	56
5.3.1. <i>Unterschiede zwischen gesamtzellulärer und lokaler RhoA-Aktivität</i> .....	56
5.3.2. <i>Effekte der potenten RhoA-Inhibition</i> .....	57
5.4. DOWNSTREAM-SIGNALVERMITTLUNG VON RHOA.....	58
5.4.1. <i>Die Rolle von Forminen an Adherens Junctions</i> .....	58
5.4.2. <i>EGFR und RhoA: Abhängigkeiten und gegenseitige Beeinflussung</i> .....	59
5.5. BEDEUTUNG DER RHOA-SIGNALVERMITTLUNG FÜR DIE METASTASIERUNG VON MAMMAKARZINOMEN .....	60
5.6. IMPLIKATIONEN FÜR DIE THERAPIE VON MAMMAKARZINOMEN UND SCHLUSSFOLGERUNG.....	61
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>64</b>
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b> .....	<b>76</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>77</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>80</b>

## Liste der Abbildungen

- Abbildung 1: E-Cadherin stabilisiert die Fulvestrant-induzierte Reorganisation von Adherens Junctions (S. 34)
- Abbildung 2: Fulvestrant induziert die spezifische Assoziation von RhoA und RRAS2 mit E-Cadherin (S. 37)
- Abbildung 3: Das Vorhandensein von RhoA, nicht aber von RRAS2, ist nötig für die Ausprägung Fulvestrant-induzierter Reorganisation von Adherens Junctions (S. 40)
- Abbildung 4: Die spezifische Hemmung der GEF-Bindedomäne von RhoA induziert der Reorganisation von Adherens Junctions ähnliche morphologische Effekte (S. 44)
- Abbildung 5: Formine sind Downstream-Effektoren von RhoA, deren Hemmung die östrogenunabhängige Reorganisation von Adherens Junctions induziert (S. 48)

## Liste der Tabellen

- Tabelle 1: Klassische molekulare Einteilung von Mammakarzinomen (S. 11)
- Tabelle 2: Geräte (S. 17)
- Tabelle 3: Chemikalien, Puffer und Lösungen (S. 18)
- Tabelle 4: Zellkulturreagenzien und Chemikalien (S. 20)
- Tabelle 5: Primärantikörper (S. 21)
- Tabelle 6: Sekundärantikörper (S. 22)
- Tabelle 7: Primer (S. 22)
- Tabelle 8: siRNA (S. 23)
- Tabelle 9: Kits (S. 23)
- Tabelle 10: Allgemeine Materialien und Reagenzien (S. 24)

## Abkürzungsverzeichnis

AJ	Adherens Junction
APS	Ammonium persulfate
AREG	Amphiregulin
Arp2/3	Actin related protein 2/3
BSA	Bovine serum albumine
CHD-1	Cadherin 1
CRC	Colorectal cancer
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EMT	Epithelial mesenchymal Transition
EPLIN	Epithelial protein lost in neoplasm
ER- $\alpha$	Östrogenrezeptor $\alpha$
EtOH	Ethanol
F-actin	Filamentous actin
FGF	Fibroblast growth factor
FH2	Formin homology domain 2
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FKS	Fetales Kalbsserum
GAP	GTPase activating proteins
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitors
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factors
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosine triphosphate
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HRP	Horse radish peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IDC	Invasive ductal carcinoma
IF	Immunofluoreszenz
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
ILC	Invasive lobular carcinoma
KD	Knockdown
LARG	Leukemia-associated Rho-GEF
LOH	Loss of heterocytosity
MCF	Michigan Cancer Foundation
mDia1	Mammalian diaphanous-related formin-1

MIM	Missing in metastasis
mRNA	Messenger RNA
mTORC1/2	Mammalian target of rapamycin complex 1/2
NaCl	Sodium chloride
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PR	Progesteron receptor
PRA	Progesteron receptor A
qPCR	Quantitative real-time PCR
RhoA	Ras homolog family member A
ROCK	Rho-Kinase
RRAS2	Ras-related protein 2
RT-PCR	Reverse-transcription PCR
S3LBC	S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-	
PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SMIFH2	Small molecule inhibitor of FH2
TEMED	Tetramethylenediamine
TFF1	Trefoil factor 1
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TNBC	Triple negative breast cancer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
WB	Western blot
YWHAZ	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta
ZA	Zonula adherens

## 1. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist das häufigste Malignom der Frau. Antiöstrogene sind wichtiger Bestandteil der Therapie Östrogenrezeptor-positiver (ER- $\alpha$ -positive) Mammakarzinome, da sie die Proliferation ER- $\alpha$ -positiver Karzinome hemmen. Das Antiöstrogen Fulvestrant führt *in vitro* in Mammakarzinomzellen zu einer Reorganisation von Adherens Junctions (AJs) und E-Cadherin. Diese Strukturen, die eng in die Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) involviert sind, haben direkte Implikationen für die Metastasierungsfähigkeit von Tumoren. Trotzdem sind AJs und deren Regulatoren bis heute nur selten Zielstrukturen zielgerichteter Tumorthérapien.

In dieser Arbeit untersuchte ich molekulare Mechanismen, die der AJ-Reorganisation nach Fulvestrant-Behandlung zugrunde liegen. Die durch Fulvestrant induzierte AJ-Reorganisation scheint strukturell stabil. Die Behandlung mit Fulvestrant führt in der Brustkrebszelllinie MCF-7/vBOS zu einer spezifischen Assoziation der regulatorischen GTPase RhoA mit E-Cadherin, dem prominentesten Adhäsionsprotein epithelialer Adhärenskontakte. Die AJ-Reorganisation scheint nur in Anwesenheit von RhoA möglich, ein Knockdown von RhoA normalisiert die Membranveränderungen. Rekombinantes, konstitutiv aktives RhoA macht die Veränderungen ebenfalls teilweise rückgängig. Eine potente Inhibition der GEF-Bindedomäne von RhoA führt zu morphologischen Veränderungen ähnlich der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation. Diese Effekte scheinen nicht auf einer Beeinflussung von ER- $\alpha$  zu beruhen. Downstream von RhoA gelang es mir, Formine als einen weiteren möglichen Effektor, der in die Fulvestrant-induzierte AJ-Reorganisation involviert ist, zu identifizieren. Darüber hinaus konnte ich auch Hinweise für eine Beteiligung des EGFR-Signaling sammeln, da ein Knockdown von Amphiregulin ebenfalls eine AJ-Reorganisation zu induzieren schien.

Diese Ergebnisse geben Rückschluss auf intrazelluläre Mechanismen, über die Effekte antiöstrogener Therapien vermittelt werden. Regulatoren des Zytoskeletts und der Zell-Zell-Adhäsion tragen vielfache Implikationen für die Metastasierung verschiedener Tumorentitäten. Ein besseres Verständnis über Effektoren und Regulation dieser Signalwege kann helfen, Ansprechen und nicht-Ansprechen auf spezifische Tumorthérapien besser zu verstehen. Ein Verständnis der involvierten Signalwege ist außerdem integral, um in Zukunft neue, immer bessere zielgerichtete Tumorthérapeutika zu entwickeln und damit die Prognose von Millionen von Mammakarzinom-Patientinnen weltweit zu verbessern.

## Abstract

Breast cancer is the most common malignancy in women. Anti-estrogenic agents are an important part of the therapy of estrogen receptor-positive (ER- $\alpha$ -positive) breast cancer, as they inhibit the proliferation of ER- $\alpha$ -positive carcinomas. The antiestrogen fulvestrant leads to a reorganization of adherens junctions (AJs) and E-cadherin in breast cancer cells *in vitro*. These structures, which are intimately involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT), have direct implications for the ability of tumors to metastasize. Still, AJs and their regulators are rarely target structures of targeted tumor therapies.

In this thesis I investigated molecular mechanisms underlying AJ reorganisation after Fulvestrant-treatment. Fulvestrant-induced AJ reorganisation appears structurally stable. Fulvestrant treatment leads to a specific association of the regulatory GTPase RhoA with E-cadherin, the most prominent adhesion protein of epithelial adhesion contacts, in MCF-7/vBOS cells. AJ reorganization seems to be possible only in the presence of RhoA, while a knockdown of RhoA normalizes the changes in membrane structure. Recombinant, constitutively active RhoA also partially reverses these changes. A potent inhibition of the GEF binding domain of RhoA leads to morphological changes similar to Fulvestrant-induced AJ reorganization. These effects do not seem to involve ER- $\alpha$  directly. Downstream of RhoA I was able to identify formins as another possible effector involved in fulvestrant-induced AJ reorganization. Furthermore, I was able to collect hints for the involvement of EGFR signaling, since a knockdown of amphiregulin also seemed to induce AJ reorganization.

These data suggest intracellular mechanisms by which the effects of antiestrogenic therapies are mediated. Regulators of the cytoskeleton and cell-cell adhesion have multiple implications for the metastasis of different tumor entities. A better understanding of the effectors and modulation of these signaling pathways may help to better understand response and non-response to specific tumor therapies. An understanding of the involved signalling pathways is also integral to the future development of new and more effective targeted tumour therapeutics and thus to improve the prognosis of millions of breast cancer patients worldwide.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Mammakarzinome: Ein Überblick**

Mammakarzinome sind mit etwa 25 Prozent der Krebsfälle die häufigsten Malignome der Frau. Mit 2,1 Millionen jährlichen Neuerkrankungen weltweit im Jahr 2018 ist das Mammakarzinom für ca. 14 Prozent aller krebsbedingten Todesfälle bei Frauen verantwortlich (World Cancer Report 2020), weltweit fordert nur das Bronchialkarzinom mehr Todesfälle (World Cancer Report 2020, vgl. auch Ferlay et al. 2012).

#### **2.1.1. Histologische Subtypen der Mammakarzinome**

Mammakarzinome können nach ihrem histologischen Bild in sogenannte *in-situ* Karzinome und invasive Karzinome unterteilt werden. *In-situ* Karzinome sind gekennzeichnet durch Wachstum, das die Basalmembran nicht überschreitet. Sie können weiter in duktales und lobuläres *in-situ* Karzinom unterteilt werden, während invasive Mammakarzinome, deren Wachstum die Basalmembran überschreitet, viele verschiedene Subtypen aufweisen (Malhotra et al. 2010).

Die häufigsten Subtypen invasiver Mammakarzinome sind das duktales (IDC) und das lobuläre (ILC) Karzinom. IDC machen etwa 75% der invasiven Mammakarzinome aus, während ILC eine Fraktion von etwa 15% bilden (Li et al. 2003). Mammakarzinome unterschiedlicher histologischer Subtypen unterscheiden sich in ihrem durchschnittlichen Tumorstadium bei Diagnose, im Wachstumsverhalten und im Ansprechen auf Tumorthapien (Li et al. 2005).

#### **2.1.2. Zelluläre Marker für die Typisierung von Mammakarzinomen**

Die molekularen Subtypen der Mammakarzinome unterscheiden sich in ihrem Rezeptorbesatz, wobei die Expressionsmuster des Östrogenrezeptors alpha (ER- $\alpha$ ), des Progesteronrezeptors (PR) und des Human epidermal growth factor Rezeptors 2 (HER2) von hervorgehobener Bedeutung sind. Ki67, ein Marker für zelluläre Proliferation, wird herangezogen um die Proliferationsraten zwischen Tumorproben zu vergleichen. Anhand der Expressionsmuster dieser Rezeptoren wird die klassische molekulare Klassifikation der Mammakarzinome (Tab. 1) erstellt (vgl. Schnitt 2010). In den letzten Jahren wird diese Einteilung durch immer feinere (molekular-)genetische Methodik ergänzt (vgl. etwa The Genome Atlas Network 2012).

Die Einteilung der Mammakarzinome anhand ihrer molekularen Beschaffenheit ist für die Therapieentscheidung von grundlegender Bedeutung. Je nach Rezeptorexpression sprechen die Subtypen besonders gut auf eine Gruppe von Therapeutika an, sind resistent gegen eine andere.

Die Subtypen Luminal A und Luminal B sind östrogenrezeptorpositive Entitäten des Mammakarzinoms, in deren Therapie Antiöstrogene eine wesentliche Rolle spielen (*Rugo et al. 2016, vgl. auch S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms 2017 [S3LBC 2017]*).

<b>Subtyp</b>	<b>ER-<math>\alpha</math></b>	<b>PR</b>	<b>HER2</b>
<i>Luminal A</i>	✓	✓	✗
<i>Luminal B</i>	✓	✓	✓
<i>HER2-positiv</i>	✗	✗	✓
<i>Triple-negativ</i>	✗	✗	✗

**Tabelle 1: Klassische molekulare Einteilung von Mammakarzinomen.**

Die verschiedenen molekularen Subtypen Luminal A, Luminal B, HER-2-positiv und Triple-negativ können anhand ihres Rezeptorbesatzes voneinander unterschieden werden. ER- $\alpha$  = Estrogen receptor  $\alpha$ , PR = Progesterone receptor, HER2 = Human epidermal growth factor receptor 2.

ER- $\alpha$  ist ein nukleärer Rezeptor, der als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor fungiert. Nach Bindung von Östrogenen bildet er Homodimere und transloziert in den Nukleus, wo er als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen reguliert. Auch die Bildung von Heterodimeren mit anderen Östrogenrezeptoren, vornehmlich ER- $\beta$ , ist beschrieben (*vgl. Heldring et al. 2007*). ER- $\alpha$  ist der im Brustgewebe vorherrschende Östrogenrezeptor, trotzdem exprimiert nur ein geringer Teil von Zellen in der gesunden Brust diesen Rezeptor (*Clarke et al. 1997*). Im Regelfall stellt sich eine inverse Beziehung von Rezeptorexpression und Zellproliferation ein – je mehr ER- $\alpha$  im Gewebe exprimiert wird, desto geringer ist dessen Proliferationsrate (*Russo et al. 1999*). Ein früher Schritt in der Tumorigenese von Brustkrebszellen ist die vermehrte ER- $\alpha$ -Expression und der Verlust der inversen Beziehung von ER- $\alpha$ -Expression und Proliferation.

In invasiven Mammakarzinomen finden sich regelhaft ER- $\alpha$ -exprimierende und gleichzeitig aktiv proliferierende Zellen (*Clarke et al. 1997*). Dieser Umstand liefert einen Teil der Erklärung, weshalb östrogenrezeptorpositive Mammakarzinome auf eine antiöstrogene Therapie ansprechen. Mit dem Ausschalten von wachstums- und proliferationsfördernden Signalwegen, die über Östrogene und deren Rezeptoren vermittelt werden, wird durch diese Therapie der Tumorprogress, das Risiko für ein Tumorrezidiv und das Metastasierungsrisiko von Brusttumoren reduziert (*Ali & Coombes 2002*).

### **2.1.3. Antiöstrogene Therapie von Mammakarzinomen**

Das prominenteste Antiöstrogen in der Therapie der Mammakarzinome ist seit jeher Tamoxifen (*Jordan 2003*). Als selektiver Modulator bzw. partieller Antagonist von ER- $\alpha$  zeigt es an Brust(krebs)zellen antiöstrogene Eigenschaften, während beispielsweise an Ovarien proöstrogene Eigenschaften im Vordergrund stehen (*Shiau et al. 1998*). Aufgrund dieses Dualismus in seiner Wirkung – und der damit verbundenen relativen Nebenwirkungsarmut – ist Tamoxifen auch heute noch das Mittel erster Wahl in der Behandlung hormonrezeptorpositiver prämenopausaler Mammakarzinome (*S3LBC 2017, vgl. auch Jordan 2003*).

Tamoxifen ist nicht das einzige Antiöstrogen, das in der Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzt wird. Postmenopausal werden vor allem Aromataseinhibitoren wie Anastrozol und Letrozol zur Behandlung östrogenrezeptorpositiver Karzinome herangezogen, als Monotherapie oder in Kombination mit Tamoxifen (*S3LBC 2017*).

Fulvestrant ist ein reiner Östrogenrezeptorantagonist. Es wird zur Therapie ER- $\alpha$ -positiver metastasierter Mammakarzinome in postmenopausalen Frauen mit Krankheitsprogression eingesetzt, wenn eine erfolglose antiöstrogene Therapie mit Tamoxifen vorangegangen ist (*Robertson et al. 2003*). Als Analogon des 17- $\beta$ -Estradiol bindet es mit hoher Affinität kompetitiv an den Östrogenrezeptor ER- $\alpha$ . Nach Bindung von Fulvestrant wird der Rezeptor-Ligand-Komplex destabilisiert und durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Zudem verhindert die Bindung von Fulvestrant an ER- $\alpha$  dessen Dimerisierung und die nukleäre Translokation des Rezeptor-Fulvestrant-Komplexes (*Scott et al. 2011*).

## **2.2. Adherens Junctions**

Die Zell-Zell-Adhäsion ist für die Morphogenese der Gewebe mehrzelliger Organismen von entscheidender Bedeutung. Zellmotilität, Zellform und die Organisation von Zellclustern in komplexe Strukturen werden durch die Zell-Zell-Adhäsion reguliert und ermöglicht (*Parsons et al. 2010*). Auf Proteinebene wird die Zell-Zell-Adhäsion durch Adhäsionsproteine reguliert, die als integrale Membranproteine in der Plasmamembran vorliegen. Solche Adhäsionsproteine zeigen oftmals eine enge Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett, das durch seine dynamische Reorganisation die Grundlage für die Ausbildung und Strukturierung verschiedener Gewebe bildet (*Nelson 2008*). In Epithelzellen wird ein Teil der Zell-Zell-Adhäsion über Adherens Junctions (AJ) vermittelt, die basal der tight junctions der Zonula occludens liegen.

### **2.2.1. E-Cadherine an der Adherens Junction**

E-Cadherin ist das prominenteste Adhäsionsprotein epithelialer AJs. Die extrazelluläre Domäne des E-Cadherin vermittelt calciumabhängige homotypische Bindungen zu E-Cadherinen benachbarter Zellen. Der zytoplasmatische Anteil des E-Cadherin geht eine Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett ein, die über Komplexe aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cateninen vermittelt wird (*Bhatt 2013*). Die Veränderung der Expressionsmuster von Cadherinen ist eine Voraussetzung für die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und damit sowohl die Embryogenese als auch die Tumorigenese und Metastasierung von Tumoren (*Kalluri & Weinberg 2009*). EMT bedeutet die Umwandlung epithelialer, polarisierter Zellen in mesenchymale Zellen. Der Verlust der Polarität führt zu einem Gewinn an zellulärer Motilität, die wiederum Invasion und Wachstum der so veränderten Tumorzellen begünstigt (*Brabletz et al. 2018*).

Eine veränderte Expression von E-Cadherin ist Endpunkt vieler zellulärer Signalwege. Hervorgehobene Bedeutung haben in diesem Zusammenhang Wachstumsfaktor-abhängiges Signaling über epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor beta (TGF-  $\beta$ ) und deren Rezeptoren, sowie Östrogene und deren Rezeptoren (*Baranwal & Alahari 2009*).

Die Lokalisation und spezifische Adhäsion von E-Cadherinen unterliegt über Interaktionen des Cadherin-Catenin-Komplexes der Regulation durch das kortikale Zytoskelett (*Nelson 2008*).

### **2.2.2. Zytoskelettale Organisation von Adherens Junctions**

Die Organisation des kortikalen Zytoskeletts ist im Wesentlichen durch den dynamischen Auf- und Abbau von Aktinfilamenten und dessen Regulatoren geprägt. Aktinmonomere lagern sich zusammen und bilden filamentöses Aktin (F-Aktin). Die langstreckigen Aktinfilamente bilden Verknüpfungen und Verzweigungen und depolymerisieren langsam selbstständig oder schnell unterstützt von regulatorischen Proteinen. In die Regulation dieser Prozesse sind u.a. der Arp2/3-Komplex, Rho-GTPasen und Formine involviert ( *Ciobanasu et al. 2012*).

Während lange Zeit vermutet wurde, dass Catenin- $\alpha$  direkt mit Aktinfilamenten interagiert (*Rimm et al. 1995*), ist inzwischen bekannt, dass es vielmehr als Mediator zwischen E-Cadherin und kortikalem F-Aktin fungiert und dabei mit Aktin-bindenden Proteinen wie Vinculin, EPLIN und Forminen interagiert (*Meng & Takeichi 2009*). Auch p120-Catenin ist an der dynamischen Regulation von AJs beteiligt und vermittelt seine Effekte auf das Aktin-Zytoskelett vor allem über eine Interaktion mit Rho-GTPasen (*Hartsock & Nelson 2008*). Diese Familie von kleinen GTPasen ist in die Bildung von Aktin-Stressfasern, Membranprotrusionen und Filopodien involviert und

beeinflusst Zellpolarität und AJ-Formation. Wenn in epithelialen Geweben Zell-Zell-Kontakte ausgebildet sind und die zelluläre Polarität etabliert ist, sind Rho-GTPasen daran beteiligt, den status quo aufrecht zu erhalten (*Braga 2000*).

### **2.2.3. Adherens Junctions: Regulation und Metastasierung**

Veränderungen in der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion bilden in vielen Tumorentitäten die Voraussetzung für die Lösung einzelner Zellen aus dem Zellverband und damit für metastatische Streuung von Tumoren (*vgl. Kalluri & Weinberg 2009*).

Dabei findet in Tumorzellen unter anderem ein Wechsel zwischen E-Cadherin, das i.d.R. Invasion und Metastasierung unterdrückt, hin zu N-Cadherin statt, das als Biomarker für EMT und maligne Transformation gilt (*Knights et al. 2012*). Im Rahmen dieser als Typ III bezeichneten Form der EMT kommt es außerdem zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die letzten Endes die Transkription und Translation wichtiger junctionaler Proteine negativ beeinflussen und damit zu einer geringeren AJ-vermittelten Adhäsion beitragen (*vgl. Elloul et al. 2005*).

Im Rahmen der neoplastischen Transformation können solche morphologischen Veränderungen von AJs und dem assoziierten kortikalen Zytoskelett beobachtet werden, die auch funktionelle Auswirkungen auf Zell-Zell-Interaktionen zeigen. Auch hier scheinen Rho-GTPasen und ihre Effektoren eine zentrale regulatorische Rolle zu spielen (*Ayollo et al. 2009*). Intakte AJ-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion unterstützt die Stabilität von Zellverbänden und senkt somit möglicherweise das Metastasierungsrisiko epithelialer Tumoren (*Kourtidis et al. 2013*).

### **2.3. Die Regulation von Adherens Junctions als Effektor zielgerichteter Tumorthérapien**

Die Entwicklung von targeted therapies, also zielgerichteter Tumorthérapien, ist ein Meilenstein in der Therapieggeschichte von Krebserkrankungen. Diese Therapien machen sich das Wissen um die molekulare Beschaffenheit von Tumoren zu Nutze, um zielgerichtet in zelluläre Prozesse einzugreifen. Im Unterschied zu regulären Chemotherapien kann so im optimalen Fall nicht nur eine auf die jeweilige Tumorentität abgestimmte Therapie erfolgen, sondern ebenfalls die Rate an Chemotherapie-typischen Nebenwirkungen reduziert werden (*Ross 2010*).

Die Bedeutung AJ-vermittelter Adhäsion für das Invasions- und Metastasierungspotential vieler Tumorentitäten ist bekannt. Trotzdem sind Komponenten der AJ nur selten Wirkstrukturen zielgerichteter Tumorthérapien. N-Cadherin-Antagonisten werden als mögliche Therapeutika diskutiert, die an der AJ-vermittelten Adhäsion ansetzen und in Zukunft eine Rolle in der zielgerichteten Therapie Cadherin-positiver epithelialer Tumoren einnehmen können (*Blaschuk &*

*Deveny 2009*). Auch Rho-GTPasen sind seit Beginn der 2000er Jahre als Ziele neuer Krebstherapien in das Zentrum wissenschaftlichen Interesses gerückt. Obwohl Therapeutika bekannt sind, die spezifisch in die Rho-GTPase-Signalvermittlung eingreifen, haben diese bisher noch keinen breiten Einzug in die klinische Tumortherapie erhalten (*vgl. Aznar et al. 2004*).

Die medikamentöse Beeinflussung der AJ-Regulation bleibt ein vielversprechendes Feld in der Entwicklung neuer, zielgerichteter Tumortherapien, in dem noch viel Forschungsbedarf besteht.

*Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript eingereicht, Europäische Patentanmeldung (EP 3517967 A1): <https://data.epo.org/gpi/EP3517967A1>; Internationale PCT- Patentanmeldung (WO 2019145517 A1): <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO201914551>, im Folgenden als „Manuskript und Patent eingereicht“) beschreiben eine durch antiöstrogene und im speziellen das Antiöstrogen Fulvestrant induzierte Änderung der Morphologie von Brustkrebszellen der Zelllinie MCF-7/vBOS. Eine Behandlung der Zellen mit Fulvestrant führt zu einer Reorganisation von Adherens Junctions (AJs). Außerdem gelang es, E-Cadherin als Readout für die Membranomorphologie nach Fulvestrantbehandlung zu etablieren. Die beobachtete Reorganisation von Adherens Junctions, E-Cadherinen und kortikalem Zytoskelett scheint außerdem für die Adhäsionsfähigkeit eines epithelialen Monolayers im Sinne der Zell-Zell-Adhäsion von Bedeutung zu sein.*

#### **2.4. Zielsetzung dieser Arbeit**

Brustkrebs ist eine häufige Erkrankung und bedeutet eine enorme individuelle und gesellschaftliche Bürde. Noch immer stellt er die häufigste krebsbedingte Todesursache von Frauen dar. Verbesserungen in der Behandlung von Brustkrebs haben positive Auswirkungen sowohl auf der Ebene der einzelnen Patientin als auch des gesamten Gesundheitssystems.

Fulvestrant, ein Medikament, das zurzeit nur in speziellen und seltenen Fällen zur Brustkrebsbehandlung vorgesehen ist, führt in MCF-7/vBOS-Zellen zu einer Reorganisation von Adherens Junctions. Andere Antiöstrogene zeigen gleiche morphologische Effekte (*Bischoff, Kornhuber et al., Manuskript und Patent eingereicht*). Diese Reorganisation ist mit einer veränderten Zell-Zell-Adhäsion assoziiert und birgt damit Implikationen für das *in vivo* Invasions- und Metastasierungspotenzial von Brustkrebszellen.

Die Regulation von AJs ist ein häufig diskutierter Ansatzpunkt zielgerichteter Tumortherapien. Ein besseres Verständnis darüber, wie diese Regulation – auch als Reaktion auf die Behandlung mit Antiöstrogenen – intrazellulär vermittelt wird, kann dazu beitragen, mögliche und sinnvolle Ansatzpunkte für targeted therapies zu identifizieren.

*Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)* charakterisierten die Reorganisation von AJs nach Fulvestrant-Behandlung. Neben Veränderungen der AJ-Morphologie fanden sie erste Hinweise für Mechanismen, die eine Signalvermittlung zwischen ER- $\alpha$  und AJs ermöglichen. Insbesondere die Rolle des kortikalen Zytoskeletts wurde durch die Arbeit von *Bischoff, Kornhuber et al.* hervorgehoben.

In dieser Arbeit habe ich molekulare Mechanismen untersucht, über die Fulvestrant seine Wirkung auf Adherens Junctions vermitteln könnte. Um die morphologischen Aspekte der AJ-Reorganisation zu charakterisieren, habe ich mich spezifischer Antikörperfärbungen von Proteinen, die an der Bildung und Aufrechterhaltung von AJs beteiligt sind, bedient. Mit Hilfe von Inhibitoren, Aktivitätsassays und zellbiologischer Methoden habe ich die Signalvermittlung zwischen dem Östrogenrezeptor ER- $\alpha$  und dem Endpunkt der AJ-Reorganisation untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, die von *Bischoff, Kornhuber et al.* erarbeiteten Ergebnisse zu stützen und zu erweitern. Insbesondere die intrazelluläre Signalvermittlung, die eine Kommunikation zwischen ER- $\alpha$  und AJs erlaubt, habe ich in dieser Arbeit genauer charakterisiert. Während *Bischoff, Kornhuber et al.* die Grundlage geschaffen haben, morphologische und mechanistische Aspekte der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation zu verstehen, hat diese Arbeit zum Ziel, die funktionelle Vermittlung der Fulvestrant-induzierten Effekte aufzudecken.

Aus diesen *in vitro* angestellten Beobachtungen können sich mit zukünftiger Forschung Möglichkeiten ableiten, um Invasion und Metastasierung *in vivo* effektiv zu begegnen.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Geräte

Tabelle 2: Geräte

<b>Gerätetyp</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Apotome.2</b>	Carl Zeiss
<b>Axio Observer.Z1</b>	Carl Zeiss
<b>CKX41 Inversmikroskop</b>	Olympus Europa
<b>Cool Snap HQ2 Kamera</b>	Photometrics
<b>Gel Documentation System</b>	Decon Science Tec
<b>Heraeus BBD 6220 CO<sub>2</sub> Inkubator</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Heraeus Labofuge 400</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Mastercycler® Nexus</b>	Eppendorf
<b>Mini Zentrifuge SU1550</b>	Sunlab Instruments
<b>Mini Protean 3</b>	BioRad
<b>Nanodrop 2000 Spektrophotometer</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>PowerPac200</b>	BioRad
<b>Tecan Microplate Reader</b>	Life Sciences
<b>THERMOstar</b>	BMG Labtech
<b>Thermostat 5320</b>	Eppendorf
<b>Trans-Blot® SD semi-dry Transferzelle</b>	BioRad

### 3.1.2. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Chemikalien, Puffer und Lösungen

<b>Name</b>	<b>Enthaltene Chemikalien</b>	<b>Konzentrationen und Volumina</b>
<b>Coomassie Stock-Lösung</b>	Methanol	120 ml
	1 Coomassie-Tablette	Gelöst in 80 ml H <sub>2</sub> O
<b>Coomassie Arbeitslösung</b>	H <sub>2</sub> O	25 ml
	Methanol	25 ml
	Stock-Lösung	50 ml
<b>Entfärbe-Lösung (Coomassie-Färbung)</b>	Essigsäure (100 %)	10 ml
	Ethanol	50 ml
	H <sub>2</sub> O	40 ml
<b>Ladepuffer (5x)</b>	Bromphenolblau	0,005 %
	Dithiothreitol (DTT)	10 mM
	Glycerol	50 %
	SDS	10 %
	Tris-HCl (pH 6.8)	250 M
<b>Lysepuffer</b>	EDTA	4 mM
	Glycerol	5 %
	NaCl	138 mM
	Tris	20 mM
	Triton X-100 (1 %)	1 %

<b>Polyacrylamid Sammelgel (5 %)</b>	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	835 µl
	APS (10 %)	50 µl
	Aqua dest.	2,87 ml
	Bromphenolblau (0,5 %)	20 µl
	SDS (20 %)	25 µl
	TEMED	5 µl
	Tris-HCl (1,5 M; pH 8,8)	1,25 ml
<b>Polyacrylamid Trenngel (10%)</b>	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	5 ml
	APS (10 %)	150 µl
	Aqua dest.	6,175 ml
	SDS (20 %)	75 µl
	TEMED	15 µl
	Tris-HCl (1,5 M; pH 8,8)	3,75 ml
<b>SDS Laufpuffer (10x)</b>	Glycin	4802.5 mM
	SDS	2,5 %
	Tris	625 mM
<b>Transferpuffer (10x) ohne Methanol</b>	Glycin	150 mM
	Tris	250 mM
<b>Transferpuffer Arbeitslösung</b>	H <sub>2</sub> O	200 ml
	Methanol	25 ml
	Transferpuffer (10x) ohne Methanol	25 ml
	NaCl	1,5 M

<b>Tris-gepufferte NaCl-Lösung</b>	Tris	0,2 M
<b>TBS (10x)</b>		

Puffer, Gele und Lösungen wurden nach den internen Standards des Labors, in dem die Forschung dieser Arbeit durchgeführt wurde, hergestellt.

### 3.1.3. Zellkulturreagenzien und Chemikalien

Tabelle 4: Zellkulturreagenzien und Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Hersteller (Nummer)</b>
<b>4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)</b>	Sigma-Aldrich
<b>DMEM 1 g/l Glukose mit Glutamin</b>	Biochrome (FG0415)
<b>DMEM 1 g/l Glukose – phenolrotfrei</b>	Gibco (11880-028)
<b>Dulbecco's phosphatgepufferte NaCl-Lösung (PBS)</b>	PAN Biotech (P04-36500)
<b>EGTA</b>	Roth (3054.1)
<b>Fetales Kalbsserum (FKS)</b>	Biochrome (S0613)
<b>FuGENE HD Transfektionsreagenz</b>	Promega (E2311)
<b>Glutamax (100x)</b>	Gibco (25050-38)
<b>HiPerFect Transfektionsreagenz</b>	Qiagen
<b>Opti-MEM</b>	Gibco (51985034)
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	Biochrome (A2212)
<b>Phalloidin, FITC-konjugiert</b>	Sigma-Aldrich
<b>Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %)</b>	Biochrome (L2143)
<b>Vollmedium</b>	DMEM 1 g/l Glukose mit Glutamin
	FKS (10 %)
	Penicillin/Streptomycin (1 %)

<b>Mangelmedium</b>	DMEM 1 g/l Glukose – phenolrotfrei
	FKS (5 %)
	Glutamax (1 %)
	Penicillin/Streptomycin (1 %)

### 3.1.4. Zelllinien

Bei der hauptsächlich in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie handelt es sich um die Mammakarzinom-Zelllinie Michigan Cancer Foundation 7 / vBOS (MCF-7/vBOS). MCF7 ist eine Mammakarzinom-Zelllinie, die aus einem Pleuraerguss einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom gewonnen wurde (Soule et al. 1973). Bei MCF-7/BOS Zellen handelt es sich um eine hoch östrogensensitive Variante der Zellen, die von A.M. Soto und C. Sonnenschein (Tufts University, Boston) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. MCF-7/vBOS Zellen sind unter den Kultivierungsbedingungen unseres Laboratoriums aus den MCF-7/BOS Zellen entstanden. Für einige Versuche wurden außerdem die Zelllinien MCF-ECadGFP (eine mit GFP-markiertem E-Cadherin transfizierte MCF7-Zelllinie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von de Beco et al., vgl. z.B. de Beco et al. 2009) und ACC114 (eine weitere Mammakarzinom-Zelllinie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von DSMZ – Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) verwendet.

### 3.1.5. Antikörper

Tabelle 5: Primärantikörper

<b>Name</b>	<b>Hersteller (Nummer)</b>	<b>Verdünnung (IF &amp; WB)</b>
<b>Monoklonal: Mouse-anti-E-Cadherin (C36) IgG</b>	BD Transduction Laboratories (BD610182)	IF: 1:100 WB: 1:1000
<b>Polyklonal: Rabbit-anti-E-Cadherin (H-108) IgG</b>	SantaCruz (sc-7870)	IF: 1:100 WB: 1:100
<b>Monoklonal: Mouse-anti-RRAS2 (M01) IgG</b>	Abnova (H00022800-M01)	IF: nicht erfolgt WB: 1:1000

<b>Monoklonal: Mouse-anti-RhoA (1B12) IgG</b>	Abcam (ab54835)	IF: nicht erfolgt WB: 1:500
<b>Monoklonal: Rabbit-anti-RhoA (EPR18134) IgG</b>	Abcam (ab187027)	IF: nicht erfolgt WB: 1:500
<b>Monoklonal: Mouse-anti-Amphiregulin (G-4) IgG</b>	SantaCruz (sc-74501)	IF: nicht erfolgt WB: 1:1000
<b>Monoklonal: Mouse-anti-Amphiregulin (C-1) IgG</b>	SantaCruz (sc-393433)	IF: nicht erfolgt WB: 1:1000

Tabelle 6: Sekundärantikörper (in Verdünnung 1:100)

<b>Name</b>	<b>Hersteller (Nummer)</b>
<b>Goat-anti-mouse-IgG-Horse-radish-peroxidase</b>	SantaCruz (sc-2031)
<b>Goat-anti-Rabbit-IgG-Cy3</b>	Jackson ImmunoResearch (111-165-144)
<b>Goat-anti-Mouse-IgG-Cy3</b>	Jackson ImmunoResearch (115-165-003)
<b>Goat-anti-Rabbit-IgG-AF488</b>	Jackson ImmunoResearch (115-545-062)
<b>Goat-anti-Mouse-IgG-AF488</b>	Jackson ImmunoResearch (111-545-045)

### 3.1.6. Plasmide

Die Plasmide pcDNA3-EGFP-RhoA-Q63L (Katalognummer 12968) und pcDNA3-EGFP-RhoA-T19N (Katalognummer 12967) wurden von der Firma Addgene bezogen.

### 3.1.7. Oligonukleotide

Tabelle 7: Primer

<b>Ziel</b>		<b>Sequenz (5'→3')</b>
<b>AREG</b>	Forward	GGTCTTAGGCTCAGGCCATTA
	Reverse	CGCTTATGGTGGAAACCTCTC

<b>RRAS2</b>	Forward	GTGAAGCTAATGTAACGGTC
	Reverse	GAGTAACAGTAGGCAACATG
<b>RHOA</b>	Forward	CAAGCATTCTGTCCCAACG
	Reverse	CCCACGGAACAGAACAACCTTT
<b>TFF1</b>	Forward	CATCGACGTCCCTCCAGAAGAG
	Reverse	CTCTGGGACTAATCACCGTGCTG
<b>PRA</b>	Forward	CTGCAGGTCTACCCGCCCTATC
	Reverse	GAATTCATTTGGAACGCCCACTGG
<b>YWHAZ</b>	Forward	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA
	Reverse	CCGCCAGGACAAACCAGTAT

Tabelle 8: siRNA

<b>Name</b>	<b>Hersteller (Nummer)</b>
<b>Flexitube Gene Solution Amphiregulin (AREG)</b>	Qiagen
<b>Flexitube Gene Solution E-Cadherin (EC1)</b>	Qiagen
<b>Flexitube Gene Solution RhoA</b>	Qiagen
<b>Flexitube Gene Solution RRAS2</b>	Qiagen
<b>Negativ-Kontroll siRNA</b>	Qiagen

### 3.1.8. Kits

Tabelle 9: Kits

<b>Name</b>	<b>Hersteller (Nummer)</b>
<b>Pierce BCA Proteinassay Kit</b>	Thermo Fisher Scientific (23225)
<b>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</b>	Applied Biosystems (4368814)

<b>RNeasy Mini Kit</b>	Quiagen (74106)
<b>DNase</b>	Quiagen (79254)
<b>RhoA Activation Assay</b>	Cell Biolabs (STA-403-A)

### 3.1.9. Allgemeine Materialien und Reagenzien

Tabelle 10: Allgemeine Materialien und Reagenzien

Name	Hersteller (Nummer)
Acrylamid / Bisacrylamid 37.5:1 (30 %)	Biorad (161.0158)
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Roth (9592.3)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma (A4503)
Bromphenol Blau	Roth (A512.1)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (D0632)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma (D5652)
Essigsäure (100 %)	Roth (6755.1)
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	Roth (X968.1)
Formaldehyd (3.7 %)	neoLab Migge (443.010.000)
Fulvestrant	Sigma (I4409)
Glycin	Sigma (G8898)
Methanol	MERCK (1.060.092.511)
Natriumchlorid	Roth (HNOO.3)
PageRuler™ Plus Prestainend Protein Ladder	ThermoScientific (26619)
PlusOne Coomassie Tabletten, PhastGel Blue R-350	GE Healthcare life science (17-0518-01)
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems (4268708.0)

Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Biorad (161-0301)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific Pierce (34080)
Tetramethylenediamine (TEMED)	SERVA (35930)
Tris	Roth (5429.2)
Triton™ X-100	Sigma (T8787)
Trockenmilch (fettfrei)	Roth (T145.3)
Tween -20	Roth (9127.1)

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Zellkultur

MCF-7/vBOS Zellen wurden in Biofreeze-Medium aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Durchführung der Experimente wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37° C aufgetaut und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 5 ml Vollmedium überführt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 96 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und alle drei bis vier Tage passagiert. Hierzu wurde das Vollmedium entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, bevor Trypsin zum Lösen der Zellen hinzugefügt wurde (0,5 ml für 25 cm<sup>2</sup>- und 1 ml für 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen). Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Trypsinwirkung durch Hinzufügen von 10 ml Vollmedium gestoppt. Die Zellen wurden so verdünnt, dass eine Konzentration von 800.000 Zellen pro 75 cm<sup>2</sup> Flasche erreicht wurde. Die Zellen wurden nach sechs Passagen verworfen.

Zur Durchführung der Experimente wurden die Zellen in Wellplatten ausgesät. Die Zellkonzentration wurde je nach der für das Experiment benötigten Konfluenz des Zellrasens gewählt. Als Richtwerte galten dabei: 600.000 Zellen pro Well in einer 6-Wellplatte für volle Konfluenz, 200.000 Zellen pro Well für teilweise Konfluenz. Die restlichen Konzentrationen wurden anhand der Oberfläche der jeweiligen Wellplatten berechnet. Einen Tag nach Aussaat war die gewünschte Konfluenz erreicht. Die Zellen wurden mit dem für das jeweilige Experiment geeigneten Behandlungsmedium versehen und über die gewünschte Dauer (zumeist zwei bis drei

Tage) behandelt, wobei das Behandlungsmedium täglich gewechselt wurde. An die Behandlung schloss sich die jeweilige Aufbereitungsmethode an (Immunofluoreszenz, RNA-Analysen, etc.).

### **3.2.2. Transfektion**

Transfektionen wurden mit dem nichtliposomalen Transfektionsreagenz FuGENE HD (Promega) durchgeführt. Für die Versuche wurden Zellen mit verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert. MCF-7/vBOS Zellen wurden in 6-Wellplatten zu je 240.000 Zellen pro Well in Mangelmedium ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Mangelmedium erneuert und die Transfektion durchgeführt. Das Transfektionsgemisch (pro beimpftem Well) bestand aus 3,3 µg des Vektors (entsprechend 2,75 µl bei einer Konzentration von 1,2 µg/µl), vermengt mit 155 µl Opti-MEM. Dem Gemisch wurden daraufhin 10 µl FuGENE (vorgewärmt auf Raumtemperatur) hinzugefügt und eine Inkubationszeit von 15 min eingehalten. Danach wurden die Zellen tröpfchenweise mit dem Transfektionsgemisch beimpft. Nach Beimischung des Transfektionsgemisches wurden die Zellen im Inkubator gelagert, bis nach 24 Stunden das Medium durch Behandlungsmedium (Vollmedium, ggf. mit Inhibitor) ersetzt wurde. Die Transfektionsrate wurde mittels ZOE™ (BioRad) überprüft.

### **3.2.3. Immunofluoreszenz**

Zellen wurden wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben ausgesät und behandelt. Nach 2-3 Behandlungstagen wurden die jeweiligen Zielproteine mithilfe spezifischer Antikörper markiert. Dazu wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min in 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert (15 min Inkubation). Anschließend wurden die Zellen abermals für 5 min mit PBS gewaschen, ein Schritt, der sich auch jedem weiteren Inkubationsschritt anschloss (sofern nicht ausdrücklich anders genannt). Die Zellen wurden mit dem Detergenz Triton X-100 (0,2 % in PBS) für 30 min permeabilisiert.

Daraufhin folgte die Blockade unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit einer Lösung von 15% fetalem Kalbserum (FKS) in PBS für eine Stunde.

Die Inkubation mit dem Erstantikörper fand entweder über Nacht bei 4° C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur statt. Danach wurden die Zellen mit einem Zweitantikörper inkubiert, der für die Spezies des Erstantikörpers spezifisch und an einen Fluoreszenzmarker gekoppelt ist. Die Inkubation fand über eine Stunde bei Raumtemperatur statt. Die Antikörper wurden in 1,5 % BSA in PBS verdünnt. In einem Teil der Experimente wurde Phalloidin, das mit Fluoreszin-

Isothiozyanat konjugiert wurde (Phalloidin-FITC) und spezifisch an filamentöses F-Aktin bindet, der Zweitantikörperlösung zugesetzt.

Auf die Antikörperfärbung folgte eine Färbung der Zellkerne mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in einer 20 ng/ml Lösung in PBS.

Das Deckglas, das die mit Antikörpern inkubierten und gefärbten Zellen enthält, wurde im Anschluss daran mit Aqua dest. vorsichtig gespült und mit Dako Fluoreszenzmedium auf einem Objektträger aufgebracht.

### **3.2.4. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) und quantitative real-time PCR (qPCR)**

Die PCR ist ein weitverbreitetes Verfahren zur Vervielfältigung von DNA. Im Rahmen der RT-PCR wird vor Durchführung einer ordinären PCR, oder wie in der vorliegenden Arbeit einer qPCR, zelluläre mRNA in komplementäre („complementary“) DNA, auch cDNA, umgeschrieben.

MCF-7/vBOS Zellen wurden wie in 2.2.1. beschrieben ausgesät und behandelt. Zur Extraktion und Aufbereitung zellulärer RNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Zellen wurden zweimalig in 1 ml PBS gewaschen (Mengenangaben beziehen sich auf einen Well einer 6-Well-Platte), in 350 µl RLT-Lysepuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. 350 µl Ethanol wurden hinzugefügt und das Gemisch auf die „mini spin columns“ (Name laut Hersteller) aufgetragen. Auf einen Waschschrift mit RW1-Puffer folgte eine fünfzehnminütige DNase-Behandlung der Proben. Sie wurden erneut mit RW1-Puffer und RPE-Puffer gewaschen. Die RNA-Konzentration der Proben wurde mithilfe des Nanodrop 2000 Spektrofotometers (ThermoFisher) bestimmt. Im Anschluss daran wurden die Proben in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80° C eingefroren.

Für die Durchführung der RT-PCR wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) verwendet. Für die Reaktion wurde 1 µg RNA mit 2 µl 10xRT-Puffer, 2 µl 10xRT-Randomprimer, 0,8 µl 25xdNTP und 1 µl Reverse Transkriptase (MultiScribe™ MuLV) versehen und RNase-freies Wasser hinzugefügt, bis ein Gesamtvolumen von 20 µl erreicht war. Die Teströhrchen, einschließlich einer RNA-freien Kontrolle, wurden in einem Thermocycler aufbereitet. Dazu wurden folgende Einstellungen verwandt: 10 min bei 25° C, 120 min bei 37° C und 5 min bei 85° C. Im Anschluss an diese Schritte wurde das Reaktionsgemisch auf 4° C abgekühlt und schließlich bei -20° C eingelagert.

Die qPCR erlaubt eine Nachverfolgung der PCR-Ergebnisse in Echtzeit und ermöglicht darüber hinaus die Quantifizierung von Amplifikationsdaten und somit die Berechnung relativer RNA-Mengen der Ausgangszellpopulationen mithilfe der sogenannten  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (auch Livak-Methode genannt).

Für einen qPCR-Ansatz wurden je 0,25  $\mu$ l des forward- und reverse-Primers mit 5  $\mu$ l SYBR Green PCR Master Mix und 1  $\mu$ l der 1:20 verdünnten cDNA vermengt. Das Gemisch wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11  $\mu$ l aufgefüllt.

Die qPCR und Analyse der Schmelzkurven der Primer (um sicherzustellen, dass nur ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert wurde) wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1) Vorphase: 2 min bei 50° C, dann 10 min bei 90° C

2) Cycling-Phase: 15 s bei 95° C, 1 min bei 60° C für insgesamt 40 Zyklen

3) Schmelzkurven-Phase: 15 s bei 95° C, 1 min Aufheizen von 60° C auf 95° C, 30 s bei 95° C und 15 s bei 60° C

Für jede cDNA-Probe wurden technische Triplikate auf derselben Probenplatte angefertigt. Als Housekeeper-Gen wurde YWHAZ (Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta) herangezogen.

### **3.2.5. Proteinextraktion, Gelelektrophorese, Western Blot und Coomassie-Färbung**

MCF-7/vBOS Zellen wurden wie in 2.2.1. beschrieben ausgesät und behandelt. Die Proteinextraktion wurde durchgeführt, indem die Wellplatten auf Eis gelagert und zweimalig mit eiskaltem PBS gespült wurden. Im Anschluss daran wurden 200  $\mu$ l eiskaltes PBS (Mengenangaben beziehen sich auf einen Well einer 6-Well-Platte) hinzugefügt, die Zellen mit Zellschabern abgeschabt und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgesammelt. Dann wurden die Zellen für eine Minute bei 13.000 g und 4° C zentrifugiert, sodass sich am Boden der Gefäße ein festes Zellpellet sammelte. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 200  $\mu$ l eiskaltem Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden für 20 Minuten auf Eis im Lysepuffer belassen, um die Lyse durchzuführen. Zur Stabilisierung der Proteine wurden im Anschluss 200  $\mu$ l Glycerol hinzugefügt, bevor das Gemisch zur Lagerung bei -20° C eingefroren wurde.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde das sogenannte Bradford- oder Bicinchoninic-Assay (BCA-Assay, siehe 2.2.8.) angewandt. Hierzu wurden 25 µl der 1:10 verdünnten Zelllysate mit 200 µl BCA-Reagenz vermischt. Um die totale Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde eine Standard-BSA-Konzentrationsreihe (0 µg / ml, 25 µg / ml, 125 µg / ml, 250 µg / ml, 500 µg / ml, 750 µg / ml, 1000 µg / ml) als Vergleichsprobe in jedem Durchlauf mitgeführt.

Das Reaktionsgemisch wurde für 30 Min bei 37° C inkubiert. Danach wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt und daraus im Vergleich mit der Standard-BSA-Konzentrationsreihe die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt. Es wurden immer technische Triplikate der jeweiligen Probe angefertigt.

Bevor mit den Proteinlysaten Western-Blot Analysen durchgeführt werden konnten, mussten die Proteine mithilfe der sogenannten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, auch SDS-PAGE genannt, aufgetrennt werden.

Hierzu wurden 20 µg Protein in Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl verdünnt. 5 µl des 5x Ladepuffers wurden hinzugefügt. Die Proben wurden bei 95° C für 3 Minuten denaturiert. Im Anschluss daran wurden die Proben auf das SDS-Gel, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für 90 Min bei 120 V durchgeführt.

Zur Analyse der aufgetrennten Proteine wurden diese im sogenannten „Western Blotting“ auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das Blotting als „halbtrockenes“ (aus dem Englischen: „semi-dry“) Blotting durchgeführt.

Dazu wurde das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen auf die nitrozellulose-Membran gebracht und der Stapel zu jeder Seite mit drei in Blotting-Puffer getränkten Filterpapieren versehen. Dann wurde er horizontal zwischen zwei Plattenelektroden aufgebracht und zwischen diesen ein elektrisches Feld (25 V, 90 Min) appliziert.

Auf das Blotting folgte die Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern. Dazu wurde die Membran zweimal für 60 min mit 6 % fettfreiem Milchpulver (in TBS gelöst) geblockt, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu besetzen. Die Membran wurde dann dreimalig für 5 Minuten in TBS und dreimalig für 5 Minuten in TBS + 0,1 % Tween 20 (TBST) gewaschen (alle weiteren Waschschriffe wurden ebenfalls in dieser Weise durchgeführt).

Die Primärantikörper wurden nach Herstellerangaben mit in TBS gelöstem 6% Milchpulver (TBS/Milch) verdünnt, meist 1 : 1000, und die Membran mit dem verdünnten Antikörper über Nacht bei 4° C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift.

Der Zweitantikörper, der zur Detektion mit HRP (horse radish peroxidase) gekoppelt vorlag, wurde in einer 1: 2000 Verdünnung in TBS/Milch für eine Stunde inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift.

Zur Detektion der HRP-Aktivität wurde das Supersignal West Femto Chemiluminescent Kit verwendet. 500 µl Luminol und 500 µl Peroxidase wurden vermengt und mit einer Pipette auf der Membran verteilt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Lumineszenz mit einem Gel-Dokumentationssystem (Decon DC Science Tec) detektiert. Dazu wurden verschiedene Expositionszeiten zwischen 5 Sekunden und 5 Minuten gewählt, um ein ungesättigtes Signal zu detektieren, das eine semiquantitative Analyse erlaubt.

Um die Gesamtmenge von aufgetragenem Protein darzustellen, wurden die Membranen mithilfe der sogenannten Coomassie-Färbung angefärbt. Dazu wurden sie für eine Minute in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und im Anschluss für 20 Min in eine Entfärbelösung eingebracht, die im Zeitverlauf dreimalig - nach 5, 10 und 15 Min - gewechselt wurde. Die getrocknete Membran wurde fotografisch dokumentiert, um semiquantitative Analysen durchzuführen.

### **3.2.6. siRNA Knockdown**

MCF-7/vBOS Zellen wurden wie in 2.2.1. beschrieben ausgesät und behandelt, statt Vollmedium wurde Mangelmedium verwendet. Die Zellen wurden inkubiert, bis ca. 60 – 80 % Konfluenz erreicht wurde. Dann wurde siRNA transfiziert. Dazu wurde die siRNA (FlexiTube GeneSolution, Qiagen) in einer variablen Menge OptiMEM aufgenommen, die eine Ziel-siRNA-Konzentration von 10 bis 20 nM ergab. FuGENE HD Transfektionsreagenz (Promega) bzw. HiPerFect Transfektionsreagenz (Qiagen) wurde nach Herstellangaben hinzugefügt. Die Zellen wurden in dem mit siRNA angereicherten Medium für 24 bis 48 Stunden inkubiert. Danach wurde das Behandlungsmedium entfernt und die Zellen wurden für weitere 24 Stunden im Mangelmedium inkubiert. Im Anschluss daran wurden Immunofluoreszenz oder Proteinextraktion und Western-Blotting (s.o.) durchgeführt.

### **3.2.7. Motilitätsassessment von Membranstrukturen**

MCF-7/vBOS Zellen wurden wie in 2.2.1. beschrieben ausgesät und behandelt. Nach 48 Stunden wurden die 6-Well-Platten aus dem Inkubator entfernt und unter das Objektiv eines Hochleistungs-Phasenkontrastmikroskops (Axio Observer.Z1 mit Apotome.2, Carl Zeiss) gebracht. Das Mikroskop wurde so programmiert, dass es in einminütigen Abständen positionsgetreue Aufnahme jedes Wells der 6-Well-Platte fertigte, über einen Zeitraum von insgesamt 100 Minuten, also 100 Bildaufnahmen pro Well. Die Aufnahmen wurden in *Fiji* (bereitgestellt als OpenSource Software von *Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al.*) geladen und die relative Position der einzelnen Membranveränderungen in jedem Bild der Serie markiert. Dann wurden die Markierungen mit *Fiji* auf ein Koordinatensystem genormt und übertragen.

### **3.2.8. RhoA-Aktivitätsassay**

MCF-7/vBOS Zellen wurden wie in 2.2.1. beschrieben ausgesät und behandelt. Die Durchführung des Assays fand streng nach der vom Hersteller in dem Assay-KIT beigefügten Gebrauchsanweisung statt.

### **3.2.9. Bioinformatische und statistische Methoden**

Die statistische Analyse der qPCR nach der Livak-Methode wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der Software *Inkscape* (Open Source) und Microsoft Power Point grafisch aufbereitet. Varianz und statistische Signifikanz wurden – je nach experimentellem Setup – mit studentischem t-Test mit oder ohne Bonferroni-Adjustierung ermittelt.

Die semiquantitative Analyse von Western Blots erfolgte mit der Software *Fiji* (bereitgestellt als OpenSource Software von *Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al.*). Bestimmung von Varianz und statistischer Signifikanz erfolgte mit studentischem t-Test. Die Daten wurden mit *Inkscape* und Microsoft Power Point grafisch aufbereitet.

Immunofluoreszenz-Bilder wurden mit der Software *Fiji* und mit *Inkscape* grafisch aufbereitet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. E-Cadherin stabilisiert die Fulvestrant-induzierte Reorganisation von AJs in MCF-7/vBOS Zellen

Die Interaktion von E-Cadherin und kortikalem Zytoskelett ist ein wesentlicher regulatorischer Bestandteil der Zell-Zell-Adhäsion von Brustkrebszellen (*Nelson 2008*). Die Fulvestrant-induzierte Reorganisation von Adherens junctions (AJ) ist ein dynamischer Prozess, der eng an Veränderungen des kortikalen Zytoskeletts gekoppelt ist (*Bischoff, Kornhuber et al., Manuskript und Patent eingereicht*). Die Bedeutung von E-Cadherin bei der Ausbildung und Stabilisierung dieser Reorganisation wurde von *Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)* bereits angedeutet und bedurfte genauerer Charakterisierung.

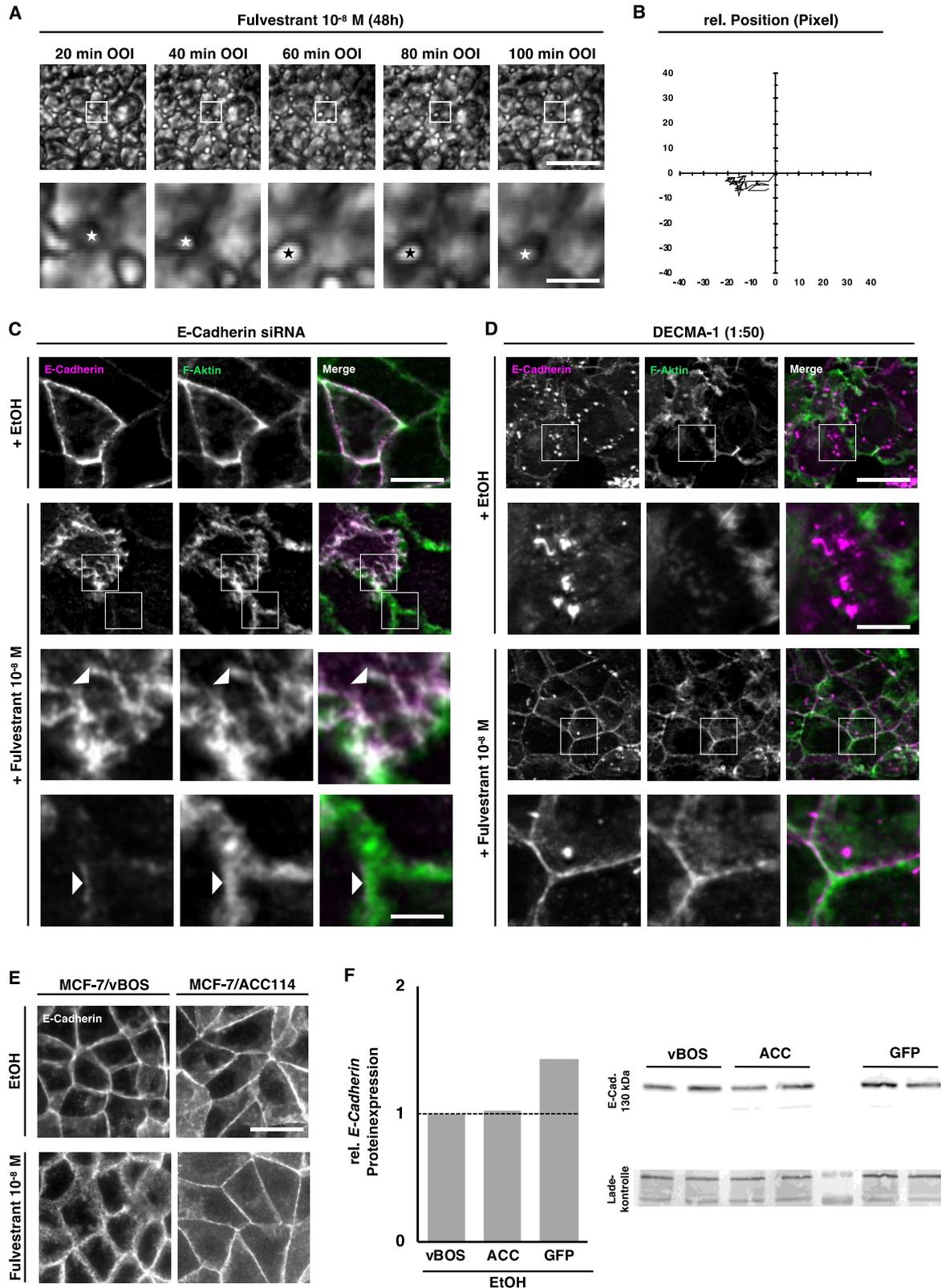
*Die Fulvestrant-induzierte Reorganisation von AJs ist strukturell stabil.* Um die Dynamik der Fulvestrant-induzierten Membranveränderungen darzustellen, wurden MCF-7/vBOS Zellen über 48 Stunden mit Fulvestrant behandelt und im Anschluss daran über einen Zeitraum von 100 Minuten unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet (Abb. 1A). Die relative Position einzelner wabenförmiger Membranveränderungen wurde aufgezeichnet und in ein Koordinatensystem übertragen (Abb. 1B). Im zeitlichen Verlauf wich die einzelne Wabe dabei nur gering von ihrer ursprünglichen Position ab.

*Ein E-Cadherin-Knockdown vermindert den Effekt von Fulvestrant auf AJs bei intakter Zell-Zell-Adhäsion.* Um zu untersuchen, ob E-Cadherin an der Aufrechterhaltung der reorganisierten AJs beteiligt ist, wurde ein Knockdown (KD) von E-Cadherin in MCF-7/vBOS Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit Fulvestrant durchgeführt. Anschließend wurden E-Cadherin und F-Aktin mittels Immunofluoreszenz (IF) dargestellt. Durch den KD konnte in einem Teil der Zellen eine deutliche Reduktion der Menge an membranständigem E-Cadherin, gemessen an der Reduktion der Fluoreszenzintensität, erreicht werden. In diesen Zellen mit Reduktion des membranständigen E-Cadherin erweckte die IF den Anschein der Normalisierung der in E-Cadherin-Färbung sichtbaren Membranstruktur, von wabenförmiger hin zu geradliniger Formation. Im Vergleich zur Gesamtheit der auf dem Objektträger dargestellten Zellen konnte diese Beobachtung nur in einem kleinen Teil der Zellen nach KD angestellt werden. In den restlichen Zellen war trotz KD keine Normalisierung sichtbar. Die Struktur des membranständigen

F-Aktin zeigte, auch wenn nun kein eindeutig wabenförmiges Muster mehr vorlag, erhebliche Unregelmäßigkeiten und teilweise wabenförmige Strukturen (Abb. 1C). Der Übergang E-Cadherin-reicher zu E-Cadherin-ärmeren Regionen schien dabei ebenso den Übergang von wabenförmig-reorganisierter zu geradlinigerer Membranstruktur zu markieren. Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, ob die Veränderung zellulärer E-Cadherin-Proteinmengen („Proteinlevel“) an der Normalisierung der Membranveränderungen beteiligt ist.

*E-Cadherin-Proteinlevel unterscheiden sich nicht in Zelllinien, die Fulvestrant-induzierte Reorganisation von AJs zeigen und solchen, die keine Effekte ausprägen.* Um der Frage nach der Bedeutung zellulärer E-Cadherin-Proteinlevel nachzugehen, wurde die Proteinexpression von E-Cadherin in verschiedenen Zelllinien untersucht. Dazu wurden MCF-7/vBOS und MCF-7/E-CadGFP Zellen als Zelllinien, die auf Fulvestrant mit der Reorganisation von AJs reagieren (siehe *Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)*) mit MCF-7/ACC114 Zellen, die keine AJ-Reorganisation zeigen, verglichen (Abb. 1E). Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Proteinexpression (Abb. 1F). Es sollte deshalb untersucht werden, ob nicht allein die Verringerung der Menge an zellulärem E-Cadherin, sondern im breiteren Sinne eine Einschränkung der homophilen E-Cadherin-Interaktion notwendig ist, um die Fulvestrant-induzierten Membranveränderungen zu normalisieren.

*Die Hemmung der homophilen E-Cadherin-Interaktion hebt die Fulvestrant-induzierte Reorganisation von AJs auf.* MCF-7/vBOS Zellen wurden während ihrer Aussaat mit dem neutralisierenden E-Cadherin Antikörper DECMA-1 inkubiert. DECMA-1 bindet die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin und verhindert somit die homophile Interaktion von E-Cadherinen (*Kobayashi et al. 2006*). Zusätzlich wurden die Zellen mit Fulvestrant behandelt. Nach 48 Stunden wurden E-Cadherin und F-Aktin mittels IF dargestellt. Die Inkubation mit DECMA-1 führte dazu, dass die Zellen keine Fulvestrant-induzierten Membranveränderungen ausprägten (Abb. 1D). Stattdessen unterlag die Organisation als Monolayer nun erheblichen strukturellen Schäden, teilweise kam es zu einer vollständigen Unterbindung der Zell-Zell-Adhäsion. Es ist außerdem zu erwähnen, dass DECMA-1-inkubierte und Fulvestrant-behandelte Zellen im Vergleich zu ausschließlich mit DECMA-1-inkubierten Zellen eine vermehrte Adhäsion sowohl an den Objektträgern der 24-Well-Platten als auch untereinander zu zeigen scheinen.



**Abbildung 1: E-Cadherin stabilisiert die Fulvestrant-induzierte Reorganisation von Adherens junctions.**

(A) Motilitätsassay der Zellen nach Fulvestrant-Behandlung. MCF-7/vBOS Zellen wurden 24h mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M behandelt und im Anschluss daran über einen Zeitraum von 100 Minuten unter dem Phasenkontrastmikroskop aufgezeichnet; OOI= out of incubator. (B) Aufzeichnung des zeitlichen Verlaufs der relativen Position einer einzelnen Wabe in einem Koordinatensystem. (C) KD von E-Cadherin in MCF-7/vBOS Zellen und Behandlung mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M für 48h. IF mit Darstellung von E-Cadherin und F-Aktin. In der Vergrößerung sind vergleichend Ausschnitte einer Zelle, in der nach KD noch E-Cadherin vorhanden ist, neben einer Zelle mit depletiertem E-Cadherin dargestellt (D) Inkubation von MCF-7/vBOS Zellen mit DECMA-1 und Behandlung mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M für 48h. IF mit Darstellung von E-Cadherin und F-Aktin. (E) Behandlung von MCF-7/vBOS- und MCF-7/ACC114-Zellen mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M über 48h. IF mit Darstellung von E-Cadherin. (F) Western-Blot Analyse der relativen E-Cadherin Proteinexpression von MCF-7/vBOS, -ACC114 und -ECadGFP Zellen im Vergleich; n = 3 (technisch), Mittelwert.

#### **4.2. Fulvestrant induziert die spezifische Assoziation von RhoA und RRAS2 mit E-Cadherin**

Die Regulation von Zytoskelett und Zell-Zell-Adhäsion unterliegt dem Einfluss komplexer zellulärer Signalkaskaden (Abb. 2A). RhoA und RRAS2 sind GTPasen, die sowohl Einfluss auf Aktin-Stressfasern als auch auf die Kontraktilität des Aktomyosin-Apparates ausüben (*Warner et al. 2019, Larive et al. 2012*). Rho-GTPasen sind u.a. upstream-Regulatoren des Arp2/3-Komplexes (*Ridley 2015*), den *Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)* als einen möglichen Mediator der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation identifizieren konnte und sind häufig an E-Cadherin-basierten AJs anzutreffen (*Priya et al. 2015*).

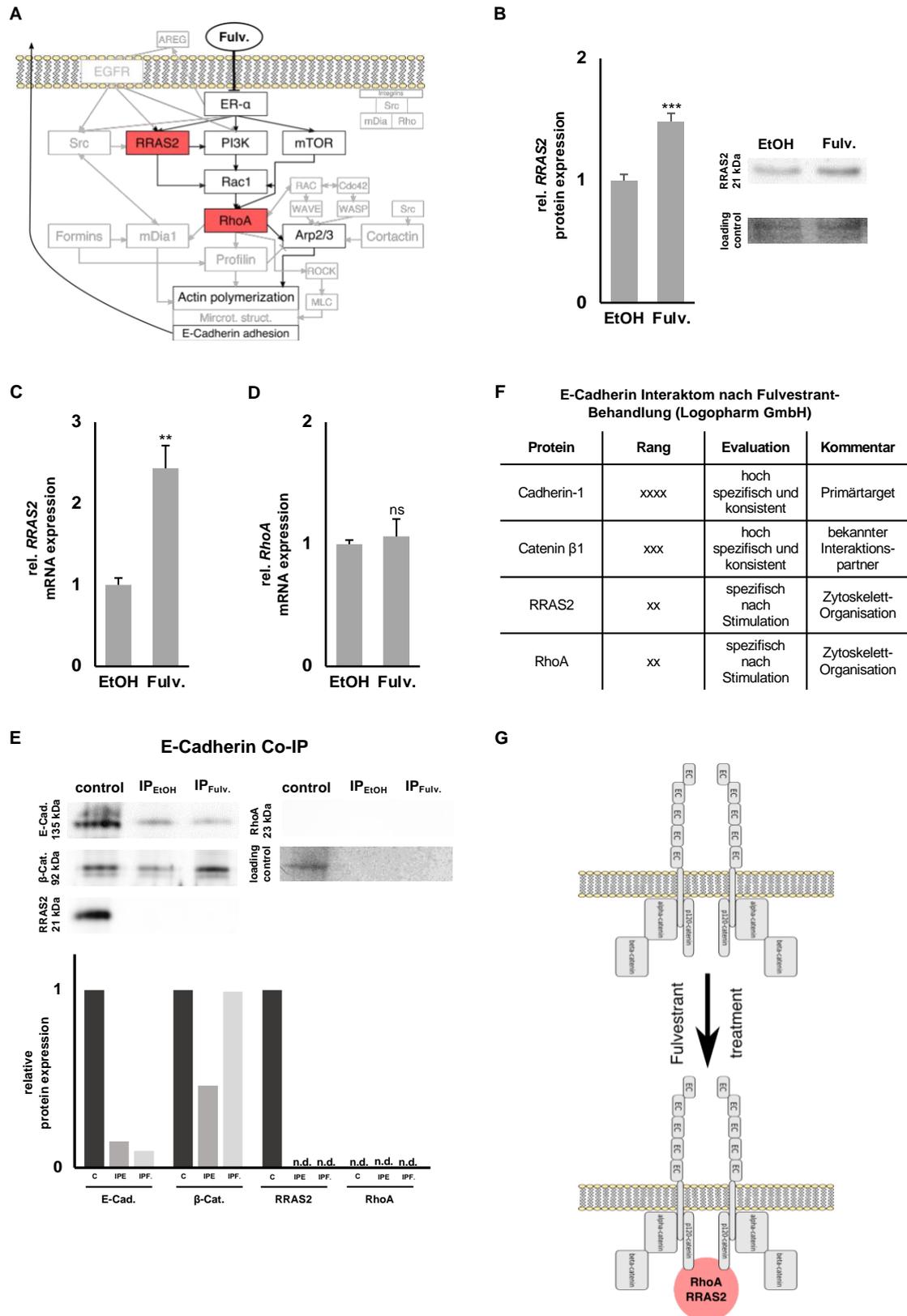
*Interaktom-Analysen identifizieren RhoA und RRAS2 als spezifische Interaktionspartner von E-Cadherin nach Behandlung mit Fulvestrant.* Um zu untersuchen, ob RhoA und RRAS2 nach Behandlung mit Fulvestrant direkt mit E-Cadherin interagieren, wurde durch die Logopharm GmbH eine Analyse des E-Cadherin-Interaktoms durchgeführt, die sowohl RhoA als auch RRAS2 als Signalproteine, die nach Behandlung mit Fulvestrant spezifisch mit E-Cadherin assoziiert sind, identifizierte (Abb. 2F, G). Diese Analyse wurde durch unsere Arbeitsgruppe in Auftrag gegeben, die Durchführung fand hingegen vollständig durch die Logopharm GmbH statt. Außerdem wurde eine Co-Immunopräzipitation von E-Cadherin nach 48-stündiger Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit Fulvestrant durchgeführt. Auch nach mehrmaliger Modifikation des Protokolls konnte keine Aussage über die Assoziation von RhoA und RRAS2 mit E-Cadherin getroffen werden. Nur in den Lysatkontrollen gelang es, Proteinbanden nachzuweisen. Sowohl in den Co-IP-Kontrollen, die mit Ethanol behandelt wurden, als auch den Co-IP Behandlungsproben mit Fulvestrant konnten RRAS2 und RhoA nicht nachgewiesen werden, wobei ein Nachweis von E-Cadherin und dem bekannterweise mit E-Cadherin assoziierten Protein beta-Catenin gelang (Abb. 2E).

*Protein- und mRNA-Expression von RRAS2 sind unter Behandlung mit Fulvestrant erhöht, mRNA-Expression von RhoA unverändert.* MCF-7/vBOS Zellen wurden über 48 Stunden mit Fulvestrant behandelt, Proteinlysate angefertigt und zelluläre mRNA extrahiert. Danach wurden Western-Blot (WB)- und qPCR-Analysen durchgeführt. Es zeigte sich eine Verdoppelung der relativen RRAS2 mRNA-Expression nach Behandlung mit Fulvestrant. Auch auf Proteinebene war die Expression von RRAS2 induziert (Abb. 2B, C). Die relative RhoA mRNA-Expression blieb unverändert (Abb. 2D).

Die hier angestellten Beobachtungen erlauben, RhoA und RRAS2 als mögliche Signalleiter in der Vermittlung Fulvestrant-induzierter AJ-Reorganisation zu identifizieren und die Effekte der Fulvestrant-Behandlung auf ihre Expression zu charakterisieren. Welche Rolle diese Proteine in der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation einnehmen, gilt es genauer zu untersuchen.

In der Immunofluoreszenz zeigten sich Limitationen der vorhandenen Antikörper. Die Antikörper gegen RRAS2 (monoklonal, mouse IgG, M01), RhoA (monoclonal, mouse IgG, 1B12 und monoclonal, rabbit IgG, EPR18134) und Amphiregulin (s.u.) (monoclonal, mouse IgG, G-4 und monoklonal: mouse IgG, C-1) erbrachten auch nach mehrfacher Modifizierung des Hersteller-Protokoll und des in 2.2.3. genannten laborinternen Protokolls keine spezifische Bindung und Färbung. (Daten nicht gezeigt).

Diese Limitationen der vorliegenden Antikörper zeigten sich ebenfalls im Western Blotting. Die Antikörper gegen RhoA (monoclonal, mouse IgG, 1B12 und monoclonal, rabbit IgG, EPR18134) und Amphiregulin (s.u.) (monoclonal, mouse IgG, G-4 und monoklonal: mouse IgG, C-1) erbrachten keine spezifischen Banden, auch nach mehrfacher Modifikation des Herstellerprotokolls und des in 2.2.5. genannten laborinternen Protokolls (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 2: Fulvestrant induziert die spezifische Assoziation von RhoA und RRAS2 mit E-Cadherin.**

(A) Übersicht über Proteine, die an der Regulation des kortikalen Zytoskeletts beteiligt sind, und deren Interaktionen. Hervorhebung von RRAS2 und RhoA; eigens erstellte Abbildung. (B) Western-Blot Analysen der relativen RRAS2-Proteinexpression in MCF-7/vBOS Zellen nach Behandlung mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M über 48h.  $n = 3$  (biologisch), Mittelwert  $\pm$  SD, \*\*\* =  $p < 0,001$ . (C) qPCR-Analysen der relativen mRNA Expression von RRAS2 und RhoA in MCF-7/vBOS Zellen nach Behandlung mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M über 48h.  $n = 3$  (biologisch), Mittelwert  $\pm$  SD, \*\* =  $p < 0,01$ , ns = nicht signifikant. (E) Co-IP von E-Cadherin nach Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M über 48h. WB-Analysen von E-Cadherin, beta-Catenin, RRAS2, RhoA; c = control, IPE = Co-IP Ethanol, IPF = Co-IP Fulvestrant, n.d. = not determined. Es ließen sich keine spezifischen Banden für RRAS2 und RhoA nach IP darstellen. Die Nachstellung der externen Ergebnisse aus Abb. 2F gelang somit in dieser Arbeit nicht (F) Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Interaktom-Analysen. Im Speziellen werden hier RhoA und RRAS2 als Proteine identifiziert, die nach Fulvestrant-Behandlung eine spezifische Interaktion mit E-Cadherin eingehen (G) Schematische Darstellung der Assoziation von RhoA und RRAS2 mit E-Cadherin in MCF-7/vBOS Zellen nach Behandlung mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M über 48h.

### **4.3. Das Vorhandensein von RhoA, nicht aber von RRAS2, ist nötig für die Ausprägung Fulvestrant-induzierter Reorganisation von Adherens junctions**

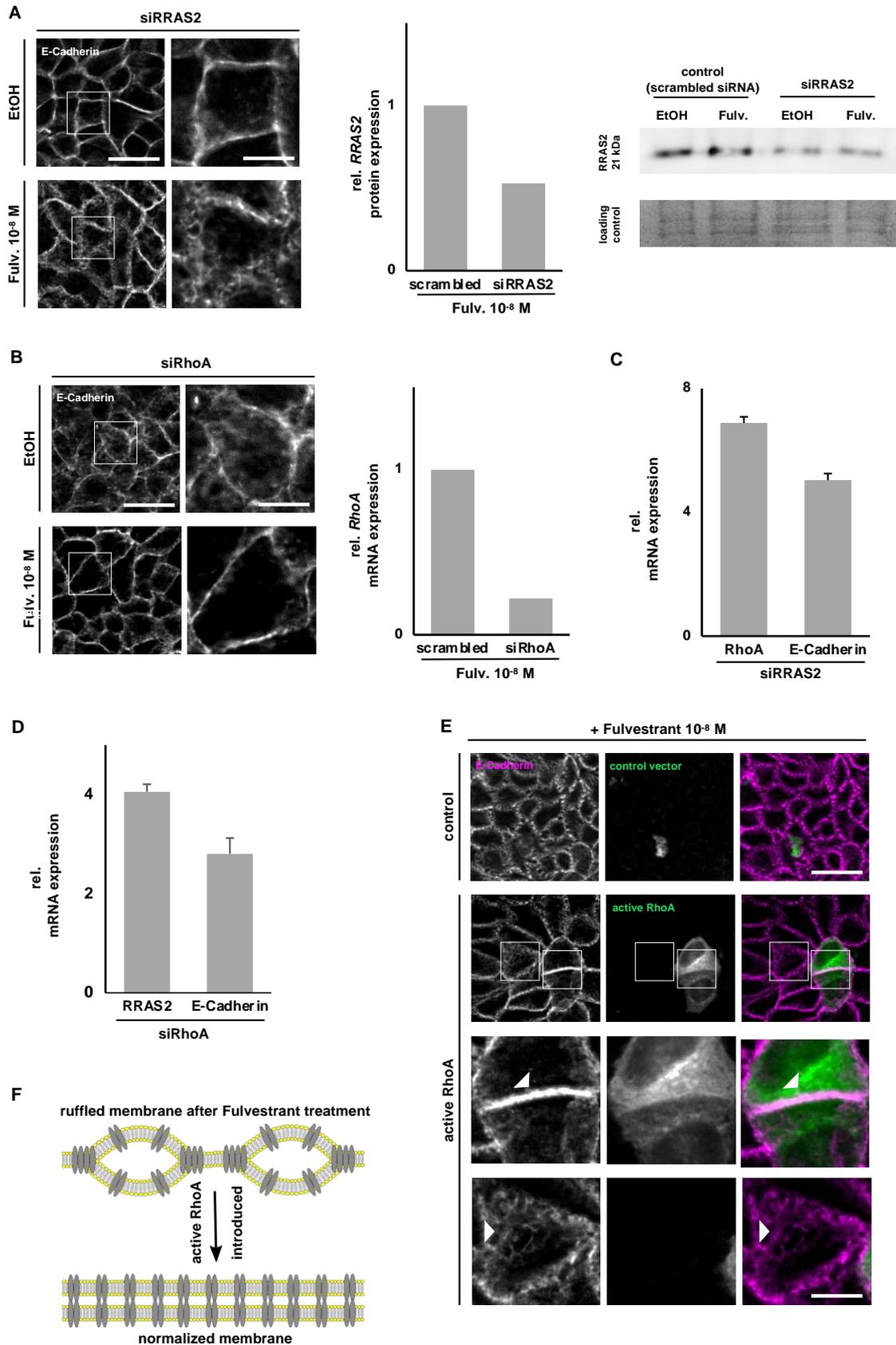
Die Behandlung mit Fulvestrant induziert die spezifische Assoziation von RhoA und RRAS2 mit E-Cadherin (Abb. 2F) und eine charakteristische Reorganisation von AJs. Sowohl RhoA als auch RRAS2 sind Regulatoren zytoskeletaler Organisationsprozesse. Es stellt sich die Frage, ob diese Proteine direkt in die Fulvestrant-induzierte Reorganisation von AJs involviert sind und ob ihr Vorhandensein in der Zelle eine notwendige Voraussetzung für diese Reorganisation darstellt.

*Ein Knockdown von RRAS2 bei zeitgleicher Behandlung mit Fulvestrant hat keinen Einfluss auf die AJ-Reorganisation.* MCF-7/vBOS Zellen wurden über 48 Stunden mit Fulvestrant behandelt und gleichzeitig ein KD von RRAS2 durchgeführt. E-Cadherin wurde mittels IF dargestellt, außerdem wurden qPCR-Analysen durchgeführt. Die relative mRNA-Expression von *RhoA* und *CDH-1* (E-Cadherin) war unter RRAS2-KD deutlich heraufreguliert (Abb. 3C). In der IF zeigt sich, dass der RRAS2-KD keine Veränderung der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation bewirkt. RRAS2-depletierte Zellen sind unverändert in der Lage, auf die Fulvestrant-Behandlung mit einer wabenförmigen Reorganisation der AJs zu reagieren (Abb. 3A). Das Vorhandensein von RRAS2 scheint somit nicht notwendig, um die Fulvestrant-induzierte AJ-Reorganisation auszuprägen.

*Ein Knockdown von RhoA bei zeitgleicher Behandlung mit Fulvestrant führt zur Normalisierung der morphologischen Effekte einer AJ-Reorganisation.* MCF-7/vBOS Zellen wurden über 48 Stunden mit Fulvestrant behandelt und gleichzeitig ein KD von RhoA durchgeführt. E-Cadherin wurde mittels IF dargestellt, außerdem wurden qPCR-Analysen durchgeführt. Die relative mRNA-Expression von RRAS2 und *CDH-1* war heraufreguliert (Abb. 3D), was die oben angestellte Vermutung einer gegenseitigen Beeinflussung der Expression dieser Proteine unterstützen kann. In der IF zeigte sich eine vollständige Aufhebung der Fulvestrant-induzierten morphologischen Membranveränderungen. Zellen, in denen RhoA depletiert wurde, konnten auf eine Behandlung mit Fulvestrant nicht mehr mit einer Reorganisation der AJs reagieren (Abb. 3B). Diese Beobachtung liefert erste mögliche Hinweise dafür, dass die zellulären Proteinlevel von RhoA einen möglichen Einflussfaktor für die Ausprägung der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation darstellen. Limitierend ist anzumerken, dass die Effizienz des KD aufgrund der Einschränkungen

vorliegender Antikörper (siehe 2.2.2. bzw. 2.2.4.) nur via qPCR überprüft werden konnte. Es gilt also, die Bedeutung von RhoA durch weitere Untersuchungen zu untermauern.

*Konstitutiv aktives RhoA macht die morphologischen Veränderungen der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation teilweise rückgängig.* MCF-7/vBOS Zellen wurden über 24 Stunden mit Fulvestrant behandelt und das konstitutiv aktive, GFP-markierte RhoA-Konstrukt Q63L transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion und Fulvestrant-Behandlung wurden die Zellen auf Deckgläsern fixiert und E-Cadherin mittels IF dargestellt. Zellen, in denen Q63L erfolgreich transfiziert wurde, zeigten trotz Fulvestrant-Behandlung keine wabenförmige Reorganisation der Zellmembran, während angrenzende, nicht RhoA-GFP-transfizierte Zellen die charakteristischen wabenförmigen Veränderungen zeigten. Im Besonderen dort, wo zwei Q63L-transfizierte Zellen aneinandergrenzten, war eine deutliche Linearisierung der in der E-Cadherin-Färbung dargestellten Membranstruktur zu beobachten, während die Linearisierung der Membranstruktur dort, wo transfizierte an nicht-transfizierte Zellen grenzten, weniger deutlich ausgeprägt war. (Abb. 3E) Diese Beobachtung legt nahe, dass konstitutiv aktives RhoA in der Lage ist, die Fulvestrant-induzierte AJ-Reorganisation teilweise zu normalisieren, insbesondere dort, wo in beiden aneinander adhärierenden Zellen konstitutiv aktives RhoA vorhanden ist (Abb. 3F). Die Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt vermuten, dass RhoA tatsächlich eine zentrale regulatorische Rolle in der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation zukommt. Um den Mechanismus der RhoA-vermittelten Effekte genauer zu charakterisieren ist es sinnvoll, die Auswirkungen direkter RhoA-Beeinflussung auf die Fulvestrant-induzierte AJ-Reorganisation zu studieren.



**Abbildung 3: Das Vorhandensein von RhoA, nicht aber von RRAS2, ist nötig für die Ausprägung Fulvestrant-induzierter Reorganisation von Adherens junctions**

(A) Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M über 48h und KD von RRAS2. IF von E-Cadherin und WB-Analysen der relativen RRAS2-Proteinexpression; Kontrolle: scrambled siRNA; n = 1. (B) Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M über 48h und KD von RhoA. IF von E-Cadherin und qPCR-Analysen der relativen mRNA-Expression von *RhoA*; Kontrolle: scrambled siRNA; n = 1. (C) qPCR-Analysen der relativen mRNA-Expression von *RhoA* und *E-Cadherin* in MCF-7/vBOS Zellen nach KD von RRAS2, n = 3 (technisch), Mittelwert SD. (D) qPCR-Analysen der relativen mRNA-Expression von *RRAS2* und *E-Cadherin* in MCF-7/vBOS Zellen nach KD von RhoA, n = 3 (technisch), Mittelwert SD. (E). IF von E-Cadherin und GFP in MCF-7/vBOS Zellen nach Behandlung mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M über 24h und Transfektion von Q63L. In der Vergrößerung sind zwei erfolgreich transfizierte, aneinander angrenzende Zellen dargestellt und die Veränderungen der Zellmembran im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen wird verdeutlicht (F) Schematische Darstellung der Normalisierung von Zellmembranen nach Einbringen konstitutiv aktiven RhoAs.

#### **4.4. Die spezifische Hemmung der GEF-Bindedomäne von RhoA induziert der Reorganisation von Adherens junctions ähnliche morphologische Effekte**

Der RhoA-Aktivitätsstatus ist ein wesentlicher Einflussfaktor auf die Regulation zytoskeletaler Prozesse (Bustelo *et al.* 2007). RhoA liegt in der Zelle in zwei Zuständen vor: einem GTP-gebundenen, aktiven und einem GDP-gebundenen, inaktiven Zustand (Jaffe & Hall 2005). Die Aktivität von RhoA wird durch Rho-GEFs (guanine nucleotide exchange factors) und Rho-GAPs (GTPase activating proteins) reguliert und so die Balance zwischen RhoA-GDP und RhoA-GTP hergestellt (Bos *et al.* 2007). Der genaue Zusammenhang zwischen RhoA-Aktivitätsstatus und Fulvestrant-induzierter AJ-Reorganisation ist noch unklar.

*Die gesamtzelluläre RhoA-Aktivität in MCF-7/vBOS Zellen bleibt nach Behandlung mit Fulvestrant unverändert.* MCF-7/vBOS Zellen wurden über 48 Stunden mit Fulvestrant behandelt, im Anschluss daran wurden Zelllysate hergestellt, aufbereitet und mit den aufbereiteten Lysaten ein RhoA-Aktivitätsassay durchgeführt (Abb. 4A). Das gesamtzelluläre RhoA-Aktivitätslevel der untersuchten Zellpopulation lag deutlich unter dem Niveau der Positivkontrollen (Daten nicht gezeigt) und war gleichermaßen klar von dem Niveau der Negativkontrollen abzugrenzen. Fulvestrant-behandelte Zellen zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der gesamtzellulären RhoA-Aktivität im Vergleich mit nicht Fulvestrant-behandelten Zellen. Zu Beginn der Behandlung ist zwar eine Tendenz zu erkennen, dass das Niveau der Fulvestrant-behandelten Zellen unter dem der Kontrollen liegen könnte, diese in der Messung beobachtete Tendenz ist statistisch allerdings nicht signifikant.

*Die potente Hemmung der GEF-Bindedomäne des RhoA durch den Inhibitor Rhosin, nicht aber die Hemmung einzelner GEFs, induziert der AJ-Reorganisation ähnliche morphologische Membranveränderungen.* MCF-7/vBOS Zellen wurden über 48 Stunden mit den RhoA-Inhibitoren Y16 und Rhosin behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen auf Deckgläsern fixiert und eine IF mit Färbung von E-Cadherin durchgeführt (Abb. 4B). Y16 bindet eine Familie von Rho-assoziierten GEFs, die sogenannten LARGs (leukemia-associated Rho-GEFs) und verhindert ihre Interaktion mit RhoA (Shang *et al.* 2013). Rhosin blockiert die GEF-Bindedomäne von Rho-Proteinen direkt (Abb. 4E) und verhindert damit eine Assoziation jeglicher GEFs an RhoA (Shang *et al.* 2012). Eine alleinige Behandlung mit Y16 führte zu keiner morphologischen Veränderung der Zellmembranen in E-Cadherin-Färbung. Bei zusätzlicher (und alleiniger) Behandlung mit

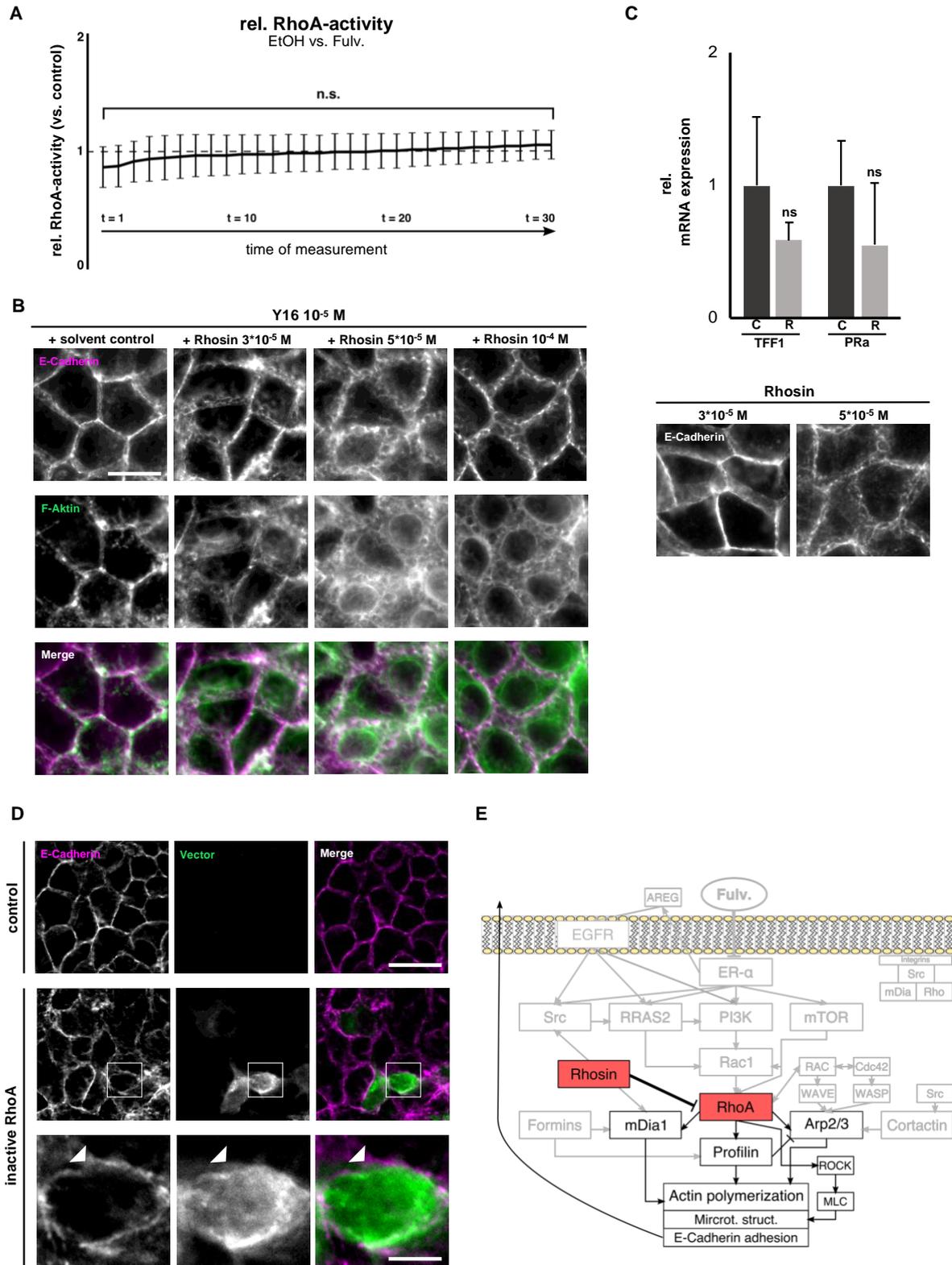
Rhosin zeigten die Zellmembranen morphologische Veränderung hin zu einem wabenförmigen Muster, die dem Bild der AJ-Reorganisation nach Fulvestrant-Behandlung stark ähnelte. Dieser Effekt war in großen Teilen des konfluenten Monolayers zu beobachten. Eine potente und globale RhoA-Hemmung, nicht aber eine Hemmung einzelner aktivierender GEFs, scheint somit in der Lage, Fulvestrant-ähnliche morphologische Effekte an der Zellmembran hervorzurufen. Diese Ergebnisse bestärken vorherige Untersuchungen und unterstreichen eine mögliche Rolle, die RhoA in der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation zukommt.

*Das Einbringen von exogenem, dominant-negativem RhoA reicht nicht aus, um morphologische Membranveränderungen hervorzurufen.* Um die Rolle des differenzierten zellulären RhoA-Aktivitätsstatus genauer zu beleuchten, wurden MCF-7/vBOS Zellen mit dem dominant-negativen, GFP-markierten RhoA-Konstrukt T19N transient transfiziert und somit exogenes, dauerhaft inaktives RhoA eingebracht. 72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen auf Deckgläsern fixiert und E-Cadherin mittels IF dargestellt (Abb. 4D). Erfolgreich transfizierte Zellen waren in der IF durch die Expression von GFP zu erkennen. Trotz erfolgreicher Transfektion des dominant-negativen RhoA-Konstrukts bildeten die Zellen keine morphologischen Membranveränderungen aus, die lineare Membranamorphologie blieb über den Monolayer unverändert erhalten. Das Einbringen von inaktivem RhoA und damit die teilweise Verschiebung des RhoA-Gleichgewichts hin zur inaktiven Form scheint somit nicht ausreichend, eine Reorganisation von Membranstrukturen zu induzieren. Vielmehr ist eine potente, globale RhoA-Hemmung notwendig, die morphologischen Membranveränderungen auszulösen.

*Durch Rhosin ausgelöste morphologische Membraneffekte kommen möglicherweise durch eine Beeinflussung der Aktivität des Östrogen-signalweges zustande.* Malissein et al. (2013) beschreiben eine mögliche Interaktion zwischen Rhosin und dem Östrogenrezeptor ER $\alpha$ . Solche Interaktionen können über die Auswirkung einer Rhosin-Behandlung auf ER $\alpha$ -responsive Gene untersucht werden. MCF-7/vBOS Zellen wurden über 48 Stunden mit Rhosin behandelt, aufbereitet und qPCR-Analysen durchgeführt. Die Expression der ER $\alpha$ -responsiven Gene *TFF1* und *PRa* wurde untersucht (Abb. 4C). Eine klassische Antiöstrogenbehandlung ließe eine deutliche Reduktion der relativen mRNA-Expression von *TFF1* erwarten. Tatsächlich war die Expression von *TFF1* reduziert, diese Reduktion war allerdings statistisch nicht signifikant. Die Expression von *PRa*, nach Antiöstrogenbehandlung klassischerweise reprimiert, zeigte ebenfalls keine statistisch signifikante Veränderung. Somit liegt zwar die Vermutung nahe, dass die Rhosin-induzierten

morphologischen Membranveränderungen nicht auf einer Beeinflussung von ER $\alpha$  beruhen, eine Beeinflussung ist allerdings beschrieben und anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht auszuschließen.

Diese Beobachtungen zusammen bestärken die zentrale Rolle, die RhoA in der Vermittlung der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation zu spielen scheint und führen gleichzeitig die Möglichkeiten auf, über eine potente RhoA-Inhibition – unabhängig von ER $\alpha$  – ähnliche morphologische Effekte zu provozieren.



**Abbildung 4: Die spezifische Hemmung der GEF-Bindedomäne von RhoA induziert der Reorganisation von Adherens junctions ähnliche morphologische Effekte**

(A) Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M über 48h, Aufbereiten von Zelllysaten und Durchführung eines RhoA-Aktivitätsassays. Gezeigt ist die relative RhoA-Aktivität über die Zeit im Vergleich zur Kontrolle;  $\Delta t = 2$  min; dupliziert (biologisch). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der gesamtzellulären RhoA-Aktivität (B) Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit  $Y16$   $10^{-5}$  M und Rhosin  $3 \cdot 10^{-5}$  M,  $5 \cdot 10^{-5}$  M und  $10^{-4}$  M über 48h. IF mit Färbung von E-Cadherin und F-Aktin. Dargestellt sind die nach Behandlung sichtbaren wabenförmigen Membranveränderungen (C) Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit Rhosin  $5 \cdot 10^{-5}$  M über 48h. qPCR-Analysen der relativen mRNA-Expression von *TFF1* und *PRA*; c = control, r = rhosin; n = 3 (biologisch); Mittelwert  $\pm$  SD, ns = nicht signifikant. IF von E-Cadherin nach Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit Rhosin  $3 \cdot 10^{-5}$  M und  $5 \cdot 10^{-5}$  M über 48h. (D) Transiente Transfektion des dominant-negativen, GFP-markierten RhoA-Konstrukts T19N in MCF-7/vBOS Zellen. IF von E-Cadherin und GFP. In der Vergrößerung wird eine erfolgreich transfizierte Zelle dargestellt, die keine wabenförmige Reorganisation der Zellmembran ausbildet (E) Schematische Darstellung der Hemmung von RhoA durch Rhosin und der betroffenen Signalwege.

#### **4.5. Formine sind Downstream-Effektoren von RhoA, deren Hemmung die östrogenunabhängige Reorganisation von Adherens junctions induziert**

Als downstream-Effektoren von RhoA sind Formine am Aufbau von Aktinfilamenten und Adherens junctions beteiligt (Young *et al.* 2010). Dem Formin mDia1 kommt eine hervorgehobene Rolle zu, da es als RhoA-Effektor direkt die lineare Aktinpolymerisation an AJs vermittelt (Citi *et al.* 2014) und somit als möglicher Mediator Fulvestrant-vermittelter AJ-Reorganisation in Frage kommt.

*Der Formininhibitor SMIFH2 induziert der AJ-Reorganisation ähnliche morphologische Membranveränderungen.* SMIFH2 (small molecule inhibitor of FH<sub>2</sub>) ist ein Inhibitor, der die FH<sub>2</sub>-Domäne von Forminen bindet (Abb. 5C) und somit die Formin-vermittelte Elongation von Aktinfilamenten unterdrückt (Kim *et al.* 2015). MCF-7/vBOS Zellen wurden für 48 Stunden mit SMIFH2 behandelt und anschließend auf Deckgläsern fixiert. E-Cadherin wurde mittels IF dargestellt. Nach SMIFH2-Behandlung zeigten sich in der E-Cadherin-Färbung morphologische Veränderungen der Zellmembranen hin zu einem wabenförmigen Muster, die der AJ-Reorganisation nach Fulvestrant-Behandlung ähneln (Abb. 5A). Somit scheinen mit Forminen, und im Speziellen dem Formin mDia1, RhoA-Effektoren identifiziert, die als mögliche Vermittler der Membranreorganisation auftreten und direkt in die Aktin-Nukleation involviert sind. Auch an dieser Stelle gilt es, eine mögliche Interaktion des Inhibitors mit dem Östrogenrezeptor-Signalweg zu überprüfen.

*Durch SMIFH2 ausgelöste morphologische Membraneffekte kommen möglicherweise auch durch eine Beeinflussung der Aktivität des Östrogenrezeptors zustande.* MCF-7/vBOS Zellen wurden für 48 Stunden mit SMIFH2 behandelt, im Anschluss zelluläre RNA isoliert und qPCR-Analysen zur Darstellung von Expressionsunterschieden der östrogenresponsiven Gene TFF1 und PRa durchgeführt. Weder TFF1 noch PRa zeigten nach SMIFH2-Behandlung signifikante Veränderungen in ihrer relativen mRNA-Expression (Abb. 5B). Eine – nicht statistisch signifikante – Reduktion wurde dennoch beobachtet. Formine kommen also möglicherweise als downstream Effektoren von RhoA in Frage, deren Inhibition unabhängig von ER $\alpha$  zu einer Reorganisation von Zellmembranen in ein wabenförmiges Muster führt, die der AJ-Reorganisation nach Fulvestrant-Behandlung morphologisch ähnelt. Eine Beeinflussung des Östrogenrezeptor-Signalweges ist allerdings nicht ausgeschlossen und erscheint ebenfalls möglich. Das Formin

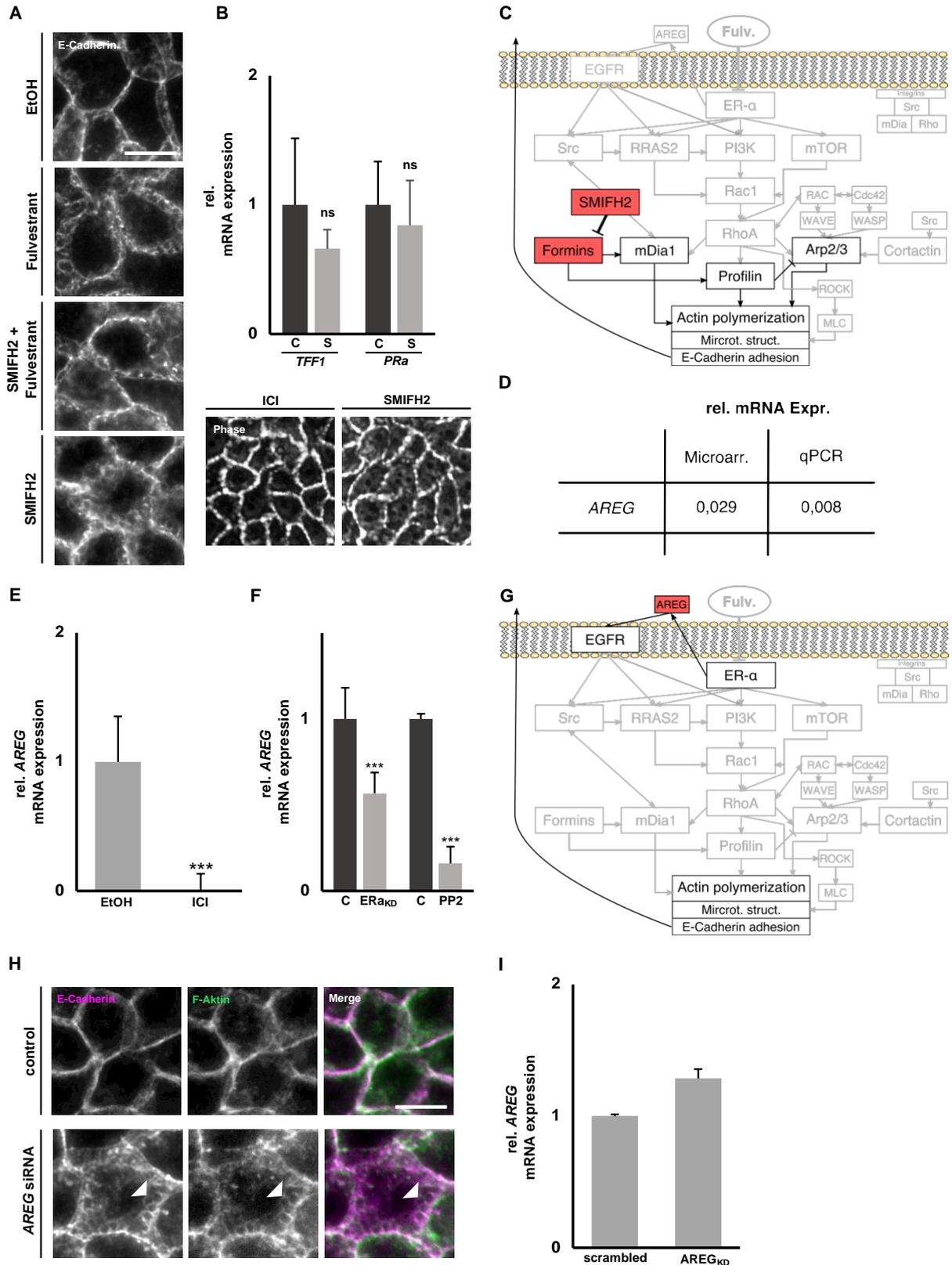
mDial wird sowohl durch RhoA- als auch durch EGFR-Signaling reguliert. Somit existiert ein weiterer möglicher Signalweg, der für die Reorganisation von AJs von Bedeutung sein kann.

*Amphiregulin (AREG) ist ein EGFR-Ligand, der in MCF-7/vBOS Zellen nach Fulvestrant-Behandlung signifikant in seiner Expression vermindert ist.* Microarray-Analysen der Genexpression in Fulvestrant-behandelten MCF-7/vBOS Zellen, die von unserer Arbeitsgruppe in Auftrag gegeben und vollständig extern durchgeführt wurden, identifizieren AREG als ein konstant in seiner Expression unterdrücktes Gen. Diese Beobachtungen decken sich mit durchgeführten qPCR-Analysen (Abb. 5D, E). Ebenso scheint die Expression von AREG unter anderen Behandlungen, die gleichfalls eine morphologische Reorganisation von Membranen in ein wabenförmiges Muster verursachen – ER $\alpha$ -KD und Behandlung mit dem Src-Inhibitor PP2 (vgl. Bischoff 2019) – konstant herunterreguliert (Abb. 5F). Diese Beobachtungen deuten auf eine mögliche Teilhabe von AREG und EGFR-Signaling an der morphologischen Membranreorganisation hin.

*Der KD von AREG in MCF-7/vBOS Zellen induziert der AJ-Reorganisation ähnliche morphologische Membranveränderungen.* Die Expression von AREG in MCF-7/vBOS Zellen wurde mittels spezifischer siRNA gehemmt. Im Anschluss wurde E-Cadherin mittels IF dargestellt und das Ergebnis durch Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Aus den KD-Proben wurde ebenfalls zelluläre RNA extrahiert. Aufgrund der Limitationen vorhandener Antikörper (siehe 3.2.2. bzw. 3.2.4.) konnte die Effektivität des AREG-KD lediglich mithilfe von qPCR-Analysen aus KD-Proben extrahierter RNA überprüft werden. Dort zeigte AREG keine Expressionsminderung. Im Gegenteil, die Expression von AREG war im Vergleich zu Kontrollen sogar leicht gesteigert (Abb. 5I). In der E-Cadherin-Färbung zeigten sich nach AREG-KD morphologische Veränderungen der Zellmembranen, die der AJ-Reorganisation nach Fulvestrant-Behandlung gleichen. In weiten Teilen des konfluenten Zellrasens waren die Membranen in ein wabenförmiges Muster organisiert (Abb. 5H). Die Effektivität des AREG-KD konnte durch qPCR-Analysen nicht bestätigt werden. Die Frage besteht, ob die Ergebnisse der qPCR einen verlässlichen Rückschluss auf die (fehlende) Effektivität des KD zulassen. Somit muss vorerst die IF des AREG-KD isoliert betrachtet werden. Dort zeigte sich, dass der KD von AREG in MCF-7/vBOS Zellen durchaus zur Ausbildung wabenförmiger Membranveränderungen beiträgt. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass es sich bei den dargestellten Experimenten um technische Replikate handelte. Eine Wiederholung des Versuches mit gleichem Versuchsaufbau zu einem

anderen Zeitpunkt erbrachte nicht das o.g. Ergebnis. Der Versuch sollte unbedingt in der Zukunft wiederholt werden, um der Frage nachzugehen, ob es sich um einen Zufallsbefund oder ein belastbares Ergebnis handelt.

Die hier angestellten Beobachtungen erlauben es zu postulieren, dass mit Forminen downstream-Effektoren von RhoA existieren, die direkt an der Aktin-Nukleation an AJs beteiligt sein können und deren Hemmung morphologische Membranveränderungen auslöst, die der AJ-Reorganisation nach Fulvestrant-Behandlung gleichen. Außerdem erlaubt der KD von *AREG* – mit seinen genannten Limitationen – die Vermutung, dass das EGFR-Signaling (Abb. 5G) ein weiterer möglicher Mediator der morphologischen Membranveränderungen ist.



**Abbildung 5: Formine sind Downstream-Effektoren von RhoA, deren Hemmung die östrogenunabhängige Reorganisation von Adherens junctions induziert.**

(A) Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M, SMIFH2  $5 \cdot 10^{-5}$  M + Fulvestrant  $10^{-8}$  M und SMIFH2  $5 \cdot 10^{-5}$  M über 48h. IF von E-Cadherin. Alle Behandlungen führen zu einer Reorganisation der Zellmembran in ein wabenförmiges Muster (B) Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit SMIFH2  $5 \cdot 10^{-5}$  M über 48h. qPCR Analysen der relativen mRNA-Expression von *TFF1* und *PRA*; n = 3 (biologisch), Mittelwert  $\pm$  SD, ns = nicht signifikant. Phasenkontrastmikroskopischer Vergleich von ICI- und SMIFH2-Behandlung. (C) Schematische Darstellung der Wirkung von SMIFH2 und beeinflusster Signalwege. (D) Tabellarischer Vergleich von Microarray- und qPCR-Analysen der relativen mRNA-Expression in MCF-7/vBOS Zellen nach Fulvestrant-Behandlung (E+F) Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit Fulvestrant  $10^{-8}$  M, PP2  $10^{-5}$  M oder KD von ER-alpha. qPCR-Analysen der relativen mRNA-Expression von *AREG*. n = 3 (biologisch), Mittelwert  $\pm$  SD, \*\*\* =  $p < 0,001$ . (G) Schematische Darstellung der Rolle von AREG auf Zellmembran-Signaling. (H+I) KD von AREG in MCF-7/vBOS Zellen. IF von E-Cadherin, F-Aktin. qPCR-Analysen der relativen mRNA-Expression von *AREG*, n = 3 (technisch), Mittelwert.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit habe ich mögliche molekulare Mechanismen untersucht, über die das Antiöstrogen Fulvestrant seine Wirkung auf die Organisation von Adherens Junctions in MCF-7/vBOS Zellen ausübt. Meine Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass E-Cadherin die Fulvestrant-induzierte Reorganisation von AJs stabilisiert und nach Aufhebung der homophilen E-Cadherin-Interaktion keine Reorganisation mehr möglich ist. Unter Behandlung mit Fulvestrant ist RhoA, das unter anderem Aktin-Stressfasern und die Kontraktilität des Aktomyosin-Apparates reguliert, vermehrt und spezifisch mit E-Cadherin assoziiert. In den durchgeführten Experimenten konnte ich Hinweise dafür sammeln, dass in dieser Interaktion von RhoA und E-Cadherin ein möglicher Bestandteil jener Signaltransduktionskaskade liegt, die eine AJ-Reorganisation nach Fulvestrant-Behandlung ermöglicht. In Abwesenheit von RhoA fand keine Reorganisation von AJs statt. Downstream des RhoA gelang es mir, Formine als mögliche Effektoren dieser Signalkaskade zu identifizieren, die in den Aufbau von AJs involviert sind und deren spezifische Hemmung, unabhängig von ER $\alpha$ , zur Reorganisation von AJs führt. Außerdem konnte ich Hinweise für eine Beteiligung EGFR-gesteuerter Signalvermittlung an den Reorganisationsprozessen generieren.

Zusammenfassend liefert meine Arbeit erste Hinweise auf das mögliche Vorhandensein einer zellulären Signalkaskade, die über die Hemmung von ER $\alpha$  zur Assoziation von RhoA an E-Cadherin führt. Downstream davon könnte sie über Formine direkt in die Formation von AJs eingreifen. Diese Beobachtungen können helfen, einen Beitrag zum besseren Verständnis zellulärer Adhäsionsprozesse in Brustkrebszellen zu leisten. *Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)* beschreiben einen möglichen Einfluss antiöstrogener Therapie auf das *in vivo* Metastasierungspotential von Brustkrebszellen. Diese Arbeit baut darauf auf und gibt Hinweise, welche zellulären Mechanismen und Signalwege zu diesem veränderten Metastasierungspotential beitragen können (Abb. 2A, Abb. 4E, Abb. 5C+G).

### 5.1. ER $\alpha$ , E-Cadherin und Adherens Junctions

Der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  und seine Signalvermittlung spielen eine integrale Rolle im Wachstum, Überleben und der (Re-)Organisation ER-positiver Brustkrebszellen. *Bouris et al. (2015)* beschreiben, wie eine Herunterregulation von ER $\alpha$  in MCF-7 Brustkrebszellen durch Infektion mit lentiviralen ER $\alpha$ -shRNA-Partikeln die Expression von E-Cadherin reprimiert und zu einer Überexpression von Markern für die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) führt. *Oesterreich et al. (2003)* hingegen beschreiben die ER $\alpha$ -vermittelte Herunterregulation von E-

Cadherin in MCF-7 Zellen und *Fearon (2003)* liefert Hinweise für möglich Signalwege, über die jene Effekte auf die Expression vermittelt werden.

*Nair & Sachdeva (2018)* fassen Mechanismen zusammen, über die ER $\alpha$ -Signaling am gesamten Metastasierungsprozess beteiligt ist. Während Mammakarzinome mit erhaltener Expression von ER $\alpha$  ein geringeres Metastasierungspotential zu besitzen scheinen (*Platet et al. 2004*), liefern *Huet et al. (2008)* Hinweise dafür, dass ein Verlust von E-Cadherin seinerseits zur verringerten Transkriptionseffizienz von ER $\alpha$  beiträgt. Diese Ergebnisse legen eine gegenseitige Regulation oder zumindest Beeinflussung der beiden Proteine nahe, die einen Einfluss auf EMT und damit Proliferation, Invasion und Metastasierung von Brustkrebszellen zu haben scheint. *Tan et al. (2017)* zeigen, dass eine vermehrte Expression von Twist, einem Transkriptionsfaktor, in aggressiven invasiven duktalem Mammakarzinomen (IDC) sowohl mit einer verminderten Expression von E-Cadherin als auch von ER $\alpha$  einhergeht.

Die Rolle von E-Cadherin- und ER $\alpha$ -Status für die Metastasierung von Mammakarzinomen untersuchten *Van Velthuysen et al. (2005)* genauer. In neu diagnostizierten Adenokarzinomen des Magens ist ER $\alpha$ -Positivität diagnostisch für Metastasen eines primären Mammakarzinoms. Ebenso ist der fehlende Nachweis von E-Cadherin in der Immunofluoreszenz stark hinweisgebend für das Vorliegen von Metastasen eines primären Mammakarzinoms.

IDC und invasive lobuläre Mammakarzinome (ILC) unterscheiden sich hinsichtlich der Expression von E-Cadherin und ER $\alpha$ . In einer Untersuchung histologischer Proben von IDC und ILC zeigten *Àsgeirsson et al. (2000)*, dass sich ca. 65% der untersuchten ILC durch einen kompletten E-Cadherin-Verlust auszeichnen, während nur ca. 20% der untersuchten IDC den gleichen Phänotyp besitzen. Ein Verlust der Heterozygotie (LOH) von E-Cadherin korreliert in ILC mit einem Verlust der Membranassoziation von E-Cadherinen, während eine intrazelluläre E-Cadherin-Fraktion verbleibt. In IDC hat LOH keinen Einfluss auf die Membranassoziation von E-Cadherin.

In nicht-ILC ist eine reduzierte E-Cadherin-Expression mit einer reduzierten Expression von ER $\alpha$  und einem „basal-like“ Phänotyp assoziiert (*Mahler-Araujo et al. 2007*), in IDC kann die Expression von E-Cadherin als prognostischer Marker eingesetzt werden (*Elzagheid et al. 2002*). Die unterschiedliche Expression von ER $\alpha$  in IDC und ILC scheint ebenfalls mit deren unterschiedlichen Proliferationsraten zu korrelieren (*Huang et al. 2014*).

*Pedersen et al. (2002)* identifizieren den Verlust von E-Cadherin als einen der wichtigsten Prädiktoren für schlechtes Outcome in IDC. Im Gegensatz dazu liefern *Gillett et al. (2001)* Hinweise dafür, dass in grade-III-IDC der Erhalt von E-Cadherin- und Catenin-Expression einen prognostisch ungünstigen Marker darstellt. Dieser Gegensatz macht den Forschungsbedarf deutlich, der bezüglich der Rolle und Regulation von E-Cadherin, auch in Zusammenhang mit der Expression von ER $\alpha$ , in IDC noch immer besteht.

In seiner Dissertation von 2019 untersucht *Bischoff* den Zusammenhang von ER $\alpha$ , E-Cadherin und Adherens Junctions in IDC. Eine Inhibition von ER $\alpha$  mit Fulvestrant in MCF-7/vBOS Zellen führt zu einer Reorganisation von AJs – und damit auch von E-Cadherin. Mit seinen Untersuchungen wirft *Bischoff* auch Fragen über ein verändertes Metastasierungspotential Fulvestrant-behandelter MCF-7/vBOS Zellen auf.

Mammakarzinom-Zellen können *in vitro* und *in vivo* kollektiv als Zellverband Gewebe infiltrieren; während in ILC bei diesem Vorgang E-Cadherin-Expression und intakte Adherens Junctions verloren gehen, durchlaufen IDC regelhaft mit vorhandenen AJs diesen kollektiven Invasionsprozess (*Khalil et al. 2017*). Diese Beobachtungen, sowie die von *Bischoff (2019)* erarbeiteten Ergebnisse verdeutlichen den Forschungsbedarf, der bezüglich der AJ (Re-) Organisation in IDC besteht.

Aus diesem Grund habe ich in der vorliegenden Arbeit versucht, Mechanismen, über die ER $\alpha$ -Signaling Einfluss auf die E-Cadherin-unterstützte AJ-Organisation in MCF-7/vBOS Zellen ausübt, zu untersuchen und genauer zu verstehen.

Eine von mir durchgeführte Motilitätsanalyse der nach Fulvestrant-Behandlung reorganisierten Membranstrukturen („Waben“) zeigt eine relative strukturelle Stabilität der einzelnen Wabe über die Zeit (Abb. 1A). Diese relative positionelle Stabilität neu organisierter Waben kann durch das kortikale Zytoskelett und zelluläre Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin erklärt werden. Die Tatsache, dass beobachtete Waben über 100 Minuten nachzuverfolgen waren, d.h. sich nicht regelmäßig abbauten und neu formierten, unterstützt diese Annahme struktureller Stabilität.

Der E-Cadherin-Turnover an Adherens Junctions ist isochron in Clustern organisiert und erlaubt damit eine quasi-Immobilität der jeweiligen AJ (*Beco et al. 2015*). Die Beobachtung der strukturellen Stabilität der Waben lässt darauf schließen, dass dieser wichtige Regulationsprozess auch nach der Behandlung mit Fulvestrant und AJ-Reorganisation intakt ist.

Durch einen Knockdown von E-Cadherin unter gleichzeitiger Fulvestrant-Behandlung konnte ich die Vermutung aufstellen, dass E-Cadherin die Stabilität der neu organisierten AJs strukturell unterstützt (Abb. 1 C+D). In Abwesenheit von E-Cadherin ist in der Immunfluoreszenz eine teilweise Normalisierung der Membran ersichtlich, auch wenn deutliche Unregelmäßigkeiten des kortikalen Zytoskeletts bestehen (Abb. 1C). An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob tatsächlich eine Normalisierung der Membranstruktur stattfindet, oder ob die Struktur der Membran in der IF in Abwesenheit von E-Cadherin lediglich schlecht zu beurteilen ist. Zur Klärung dieser Frage sollten weitere Untersuchungen, z.B. mit Färbung weiterer Membranproteine, durchgeführt werden. Auch empfiehlt sich eine phasenkontrastmikroskopische Betrachtung der Zellverbände nach E-Cadherin-Knockdown, da hier unter Umständen die grobe Membranstruktur besser zu überblicken ist und in der IF angestellte Vermutungen zu stützen sind.

Eine Hemmung der homophilen E-Cadherin-Interaktion macht die Reorganisation von AJs scheinbar unmöglich (Abb. 1D). Bei gleichzeitiger Hemmung der homophilen E-Cadherin-Interaktion und Behandlung mit Fulvestrant ist eine vermehrte bzw. stabilisierte Adhäsion der Zellen untereinander und an den Objektträgern zu verzeichnen (Abb. 1D), was Beobachtungen von *Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)* bezüglich einer größeren Stabilität des zellulären Monolayers nach Fulvestrant-Behandlung stützt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass E-Cadherin eine stabilisierende Funktion bei der Ausprägung der Fulvestrant-induzierten Reorganisation von AJs zukommt. Es agiert somit möglicherweise als Mediator zwischen kortikalem Aktomyosin-Zytoskelett der einzelnen Zelle und der Organisation des Zellverbundes im Monolayer. Eine stabile E-Cadherin-Adhäsion in Brustzellen ist mit einem geringeren Risiko maligner Entartung und mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit spontaner EMT assoziiert (*Andrews et al. 2012*).

Mammakarzinome zeigen eine differenzierte E-Cadherin-Expression. *Chao et al. (2010)* beschreiben die unterschiedliche E-Cadherin-Expression *in situ* in primären Mammakarzinomen und ihren Metastasen. Dabei gehen sie auch auf den Zyklus von initialer Cadherin-Positivität des Primarius, E-Cadherin-Verlust und letztlich -Reexpression in Metastasen ein.

In gesundem Brustgewebe ist E-Cadherin an den Zell-Zell-Kontakten von luminalen Epithelzellen lokalisiert, im Verlauf der malignen Transformation geht es dann häufig verloren; die letzte Aktivität von E-Cadherin in Brustkrebszellen ist dynamisch und kann durch endogene (z.B. insulin-like growth factor 1, IGF-1) und exogene (z.B. Tamoxifen) Einflüsse reguliert werden

(*Whelock, Soler & Knudsen 2001*). *Kowalski et al. (2003)* zeigen, dass von ihnen untersuchte IDC-Metastasen hohe E-Cadherin-mRNA-Expressionsspiegel aufweisen, teilweise sogar höher als die des Primarius. Die Unterschiede in der Expression von E-Cadherin in IDC, ILC und deren Metastasen erklären sich durch vollständige oder teilweise Gendeletion und Chromatin-Neuordnung (*Hiraguri et al. 1998, Hennig et al. 1995*). Auch die Bildung des Transkriptionsfaktors Twist, der E-Cadherin- und ER $\alpha$ -Expression negativ beeinflusst, scheint hierbei eine Rolle zu spielen (*Vesuna et al. 2008*), ebenso wie die Promoter-Inaktivierung durch Hypermethylierung von 5' CpG-Inseln von E-Cadherin und ER $\alpha$  (*Nass et al. 2000*).

Ein Wissen um die mRNA-Expressionsspiegel und Verteilung von E-Cadherin scheint somit integral, um die Metastasierungsfähigkeit von Mammakarzinomzellen zu verstehen. In dieser Arbeit konnte ich durch Experimente darstellen, dass sich die Proteinspiegel von E-Cadherin in Brustkrebszellen, die auf eine Fulvestrant-Behandlung mit AJ-Reorganisation reagieren und solchen, die keine Reaktion zeigen, nicht signifikant unterscheiden (Abb. 1E, F). Die geringe Erhöhung der E-Cadherin-Proteinlevel in MCF-7/E-CadGFP Zellen erklärt sich möglicherweise durch das Vorliegen von transgenem GFP-markierten E-Cadherin zusätzlich zu regulär vorhandenem zellulären E-Cadherin. Während *Oesterreich et al. (2003)* eine durch ER $\alpha$  vermittelte Herunterregulation von E-Cadherin in MCF-7 Zellen beschreiben, zeigen Arbeiten anderer Autoren gegenteilige Effekt (*vgl. etwa Ye et al. 2010*).

*Fearon (2003)* analysiert in seiner Arbeit mögliche Signalwege, über die ER $\alpha$  eine verminderte Transkription von E-Cadherin bewirkt. Er beschreibt dabei unter anderem den Einfluss von MTA3, Teil eines Transkriptions-Repressions-Komplexes, der den Transkriptionsfaktor Snail reguliert, der letztendlich die Expression von E-Cadherin beeinflusst. *Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)* konnten zeigen, dass eine Fulvestrant-Behandlung (und damit ER $\alpha$ -Inhibition) in MCF-7/vBOS Zellen keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von E-Cadherin hat. Die Fulvestrant-vermittelte AJ-Reorganisation wird somit möglicherweise über einen vom Level an zellulärem E-Cadherin unabhängigen Mechanismus vermittelt. Es ist denkbar, dass hier die Rolle von Cadherinen als Signal-Transducer zum Tragen kommt. Die intrazelluläre Signalvermittlung von Cadherinen wird unter anderem durch Catenine gesteuert, die eine Verbindung zum kortikalen Zytoskelett herstellen (*vgl. Nelson 2008*).

Wenn E-Cadherin für die Stabilität der AJ-Reorganisation von Bedeutung ist, die Menge an zellulärem E-Cadherin jedoch keinen Ausschlag für die Reorganisation gibt, liegt es nahe, dass

die Umverteilung von E-Cadherin über Faktoren, die auch das kortikale Zytoskelett regulieren, vermittelt wird. Auch ein veränderter E-Cadherin turnover an der Membran, also eine Veränderung derjenigen Prozesse, die für den Ein- und Ausbau von E-Cadherinen in die Zellmembran verantwortlich sind, ist denkbar.

## **5.2. E-Cadherin und RhoA: Zytoskelettregulation und Zell-Zell-Adhäsion**

Rho-GTPasen sind vielgestaltig in die dynamische Reorganisation zellulärer Oberflächenstrukturen involviert und gehen dabei direkte Interaktion mit dem kortikalen Zytoskelett ein (*de Curtis und Meldolesi 2012*). E-Cadherin gilt als wichtiger Anker, der Zelloberfläche und kortikales Zytoskelett verbindet und an der Bildung von Adherens Junctions beteiligt ist (*Bhatt et al. 2013*).

*Wu et al. (2015)* konnten zeigen, dass ein Clustering von E-Cadherin auch unabhängig von homophiler E-Cadherin-Interaktion geschehen kann. Diese Beobachtung eröffnet die Möglichkeit einer durch zytoskelettale Prozesse vermittelten a-priori-Cadherin-Reorganisation in spezifische Cluster, die sich morphologisch als AJ-Reorganisation präsentiert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen, die von *Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)* durchgeführt wurden, zeigen dass E-Cadherin im Rahmen der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation in Clustern organisiert ist und es zu einer relativen E-Cadherin-Depletion zwischen diesen Clustern kommt.

In Kooperation mit der Logopharm GmbH wurden im Rahmen dieser Arbeit Analysen des E-Cadherin-Interaktoms durchgeführt. Dabei handelt es sich um die Summe an Proteinen, die mit E-Cadherin spezifische und direkte Interaktionen eingehen. Deren Kenntnis ermöglicht es, Proteine zu identifizieren, die möglicherweise an der Signalvermittlung zwischen ER $\alpha$  und E-Cadherin – und damit auch an der AJ-Reorganisation – beteiligt sind.

Die Analyse zeigt, dass in MCF-7/vBOS Zellen nach Behandlung mit Fulvestrant eine spezifische Assoziation von RhoA an E-Cadherin entsteht (Abb. 2F). Es ist bekannt, dass E-Cadherine und mit ihnen assoziierte Proteine wie  $\alpha$ -Catenin in der Lage sind, Rho-GEFs und Rho-GAPs zu rekrutieren und den lokalen Aktivitätsstatus von RhoA an AJs zu beeinflussen (*vgl. etwa Evers et al. 2000*). An Adhäsionskontakten kommt es zu einer vermehrten Co-Lokalisation von E-Cadherin und RhoA (*Ratheesh et al. 2012*). Die Interaktom-Analysen liefern Hinweise dafür, dass im Rahmen dieser Co-Lokalisation auch eine spezifische Interaktion, zumindest aber eine spezifische Assoziation, dieser beiden Proteine vorliegt (Abb. 2G).

Es ist zu erwähnen, dass es mir in der vorliegenden Arbeit nicht gelang, die von der Logopharm GmbH erarbeiteten Ergebnisse zu verifizieren (Abb. 2E). Deshalb sollten, um die oben angestellten Annahmen zu stützen, unbedingt erneute Untersuchungen des Interaktoms, z.B. mit Modifikation des Protokolls für die Co-Immunopräzipitation und der Wahl neuer bzw. anderer RhoA-Antikörper, durchgeführt werden. Ohne diese zusätzlichen Untersuchungen dürfen die hier dargestellten Ergebnisse nur unter Vorbehalt betrachtet werden.

Mit dem Nachweis einer direkten Assoziation des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin und des Zytoskelettregulators RhoA wird ein möglicher Bestandteil derjenigen Signaltransduktionskaskade ermittelt, die für die AJ-Reorganisation nach Fulvestrant-Behandlung verantwortlich ist. Zur Kontextualisierung dieser Ergebnisse ist es sinnvoll, einen Überblick über die bekannten Interaktionen von RhoA und ER $\alpha$  zu schaffen.

*Giretti et al. (2008)* liefern Hinweise dafür, dass die Aktivierung des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  über extra-nukleäre Signalvermittlung zu einer Aktivierung von RhoA führt und so zytoskelettale Umbauprozesse, wie die Bildung von Membranprotrusionen, lenkt. Die Aktin-Nukleation an Membranprotrusionen, auch bei der Bildung von Adhäsionskontakten, wird durch Rho-Proteine und ihre Effektoren getrieben (*Sit & Manser 2011*).

In dieser Arbeit konnte ich Hinweise dafür sammeln, dass die durch Fulvestrant ausgelöste AJ-Reorganisation nur in Anwesenheit von RhoA stattfinden kann. Ein Knockdown von RhoA in MCF-7/vBOS Zellen führt dazu, dass die Zellen auf eine Behandlung mit Fulvestrant nicht mehr mit einer AJ-Reorganisation reagieren (Abb. 3B). Es liegt somit nahe, dass die Reorganisation von AJs zumindest teilweise durch RhoA geleitete Umbauprozesse des kortikalen Zytoskeletts gelenkt wird, die nach RhoA-Depletion nicht mehr stattfinden können. Limitierend ist anzumerken, dass aufgrund methodischer Einschränkungen (siehe 2.2.2. bzw. 2.2.4.) die Effizienz des RhoA-Knockdown nur via qPCR überprüft werden konnte. Die mRNA-Expression des Zielproteins stellt allerdings nur eine Annäherung für die tatsächlich vorhandene Proteinmenge dar, da die mRNA-Expression wohlmöglich anderen Einflussfaktoren unterliegt, die durch das Experiment nicht erfasst werden. Generell sollte die Überprüfung der Knockdown-Effizienz über Analysen der Menge an vorhandenem Protein geschehen. Diese Untersuchungen müssen in künftigen Arbeiten zu diesem Thema verifiziert werden.

Zusammenfassend kommt es nach Fulvestrant-Behandlung in MCF-7/vBOS Zellen im Rahmen der AJ-Reorganisation zu einer spezifischen Assoziation von RhoA und E-Cadherin. RhoA ist unmittelbar in die Organisation des Zytoskeletts involviert, ohne das Vorhandensein von RhoA findet keine AJ-Reorganisation statt. Diese Beobachtungen lassen einen Einfluss der Fulvestrant-Behandlung auf die zelluläre RhoA-Aktivität vermuten.

### **5.3. Die differenzierte Aktivität von Rho-GTPasen an Adhäsionskontakten**

RhoA durchläuft in der Zelle einen Kreislauf aus zwei Zuständen: einem „aktiven“, GTP-gebundenen und einem „inaktiven“, GDP-gebundenen Zustand. Rho-GEFs und Rho-GAPs vermitteln den Austausch von Phosphatgruppen, während Rho-GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) die Dissoziation von GDP verhindern und somit RhoA-GDP stabilisieren (*Jaffe & Hall 2005*).

#### **5.3.1. Unterschiede zwischen gesamtzellulärer und lokaler RhoA-Aktivität**

Ergebnisse, die ich erarbeitet habe, legen nahe, dass die Fulvestrant-Behandlung in MCF-7/vBOS Zellen keinen Einfluss auf die gesamtzelluläre RhoA-Aktivität hat (Abb. 4A). *Pertz (2010)* gibt in seiner Arbeit einen Überblick über die komplexen zeitlich-räumlichen Unterschiede in der zellulären RhoA-Aktivität. So scheinen Rho-Proteine in der Lage, zur gleichen Zeit an unterschiedlichen intrazellulären Lokalisationen verschiedene Effektoren zu bedienen. Die gezielte lokale Aktivierung von RhoA, auch bei vermeintlich „inaktivem“ gesamtzellulärem RhoA-Signaling, kann zytoskelettale Umbauprozesse initiieren und zur Ausbildung von Membranfurchen führen (*Wagner & Glotzer 2016*).

Um der Frage nach dem lokalen RhoA-Aktivitätsstatus an AJs nachzugehen, habe ich ein konstitutiv aktives RhoA-Konstrukt in mit Fulvestrant behandelte MCF-7/vBOS Zellen eingebracht. Dieses dauerhaft aktive RhoA scheint in der Lage, die Fulvestrant-induzierte AJ-Reorganisation zu normalisieren (Abb. 3E, F).

Da die Fulvestrant-Behandlung keinen Einfluss auf die gesamtzelluläre RhoA-Aktivität hat, ist somit denkbar, dass die Fulvestrant-induzierte Assoziation von RhoA und E-Cadherin zu einer lokalen Inaktivierung von Cadherin-assoziiertem RhoA führt, oder zytoskelettale Umbauprozesse zu einer Anhäufung von inaktiviertem RhoA führen, welches dann vermehrt mit E-Cadherin assoziiert. Durch das Einbringen von konstitutiv aktivem RhoA kommt es möglicherweise zu einer Verdrängung des inaktivierten RhoA und somit zu einer Normalisierung der AJs. Alternativ ist es

möglich, dass allein die vermehrte zelluläre RhoA-Aktivität über ihre Effekte auf das Zytoskelett zu dieser Normalisierung führt. Diesen Überlegungen muss in folgenden Arbeiten nachgegangen werden.

### **5.3.2. Effekte der potenten RhoA-Inhibition**

Die Effekte der RhoA-Aktivierung auf das Metastasierungspotential verschiedener Tumorentitäten sind gut untersucht.

In der kolorektalen Krebs(CRC)-Zelllinie HT-29 führt eine Integrin-abhängige Aktivierung von RhoA zu vermehrtem Metastasierungs- und Invasionspotential (*Ariake et al. 2012*). Auch die Aktivierung von mTORC1/2 führt in CRC zu einer vermehrten RhoA-Aktivität und darüber hinaus zu einem höheren Metastasierungspotential (*Gulhati et al. 2011*). *Lei et al. (2014)* zeigen, dass die Hemmung von MIM (missing in metastasis) in MCF10-4T1 Brustkrebszellen zu einer RhoA-Aktivierung führt, die die Metastasierung der Zellen begünstigt.

*El-Sibai et al. (2008)* liefern Hinweise dafür, dass eine direkte RhoA-Inhibition durch Mikroinjektion der Clostridium botulinum ADP-ribosyltransferase C3 (C3T) im Brustkrebsmodell der Maus die zelluläre Motilität einschränkt und somit möglicherweise das Metastasierungspotential senkt.

In dieser Arbeit konnte ich Hinweise dafür sammeln, dass die Inaktivierung einzelner RhoA-GEFs durch den Inhibitor Y16 in MCF-7/vBOS Zellen keine morphologischen Membraneffekte provoziert (Abb. 4B). Auch das alleinige Einbringen von exogenem, dauerhaft inaktivem RhoA scheint keine Veränderungen der Membranstruktur zu erzeugen (Abb. 4D). Dagegen führt eine vollständige, direkte und potente Hemmung der GEF-Bindedomäne von RhoA mittels Rhosin zu morphologischen Membranveränderungen, die der AJ-Reorganisation nach Fulvestrant-Behandlung gleichen (Abb. 4B, C). Es ist anzumerken, dass es zwischen Experimenten deutliche Unterschiede in der Ausprägung der beobachteten morphologischen Effekte gab. Eine Kontrolle des Inaktivierungsgrades wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Die Ergebnisse sollten daher unbedingt durch weitere Untersuchungen verifiziert werden. Beispielsweise erscheint eine Kontrolle des Inaktivierungsgrades von RhoA nach Inkubation mit den verschiedenen Inhibitoren durch erneute Durchführung von RhoA-Aktivitätsassays sinnvoll. Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte von Rhosin scheinen nicht durch eine Rhosin-vermittelte Hemmung des ER $\alpha$ -Signaling zustande zu kommen (Abb. 4C, vgl. *Mallisein et al. 2013*).

In Zusammenschau der in dieser Arbeit angestellten Beobachtungen zu gesamtzellulärer RhoA-Aktivität nach Fulvestrant-Behandlung, Normalisierung der AJ-Reorganisation durch aktives RhoA und der Effekte einer potenten RhoA-Hemmung auf Membranstrukturen erscheint eine Beteiligung von RhoA an der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation nicht nur möglich, sondern wahrscheinlich. In künftigen Untersuchungen sollte die genaue Rolle, die RhoA dabei einnimmt, unbedingt weiter beleuchtet werden.

#### **5.4. Downstream-Signalvermittlung von RhoA**

RhoA ist über seine Effektoren am Aufbau von Aktin-Stressfasern, kortikalem Zytoskelett, Lamellipodien und Filopodien beteiligt (*Warner et al. 2019*). Rho-Kinase (ROCK) ist ein Downstream-Effektor von RhoA, der Auf- und Abbau des Aktomyosin-Zytoskeletts reguliert (*Amano et al. 2010, Yao et al. 2010*).

*Oviedo et al. (2010)* zeigen in ihrer Arbeit, dass Estradiol in HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) Proliferation, Formation von Aktin-Stressfasern und Migration über den RhoA/ROCK-Signalweg stimuliert.

Beim Aufbau von Aktin-Fasernetzwerken kooperiert ROCK mit einem anderen RhoA-Effektor, mDia1 (*O'Connor & Chen 2013*), einem Formin. Formine haben direkten Einfluss u.a. auf Auf- und Abbau von Aktin-Fasern und Mikrotubuli, Zellpolarität und die Regulation fokaler Zelladhäsion (*Young et al. 2010*).

##### **5.4.1. Die Rolle von Forminen an Adherens Junctions**

Die Formine mDia1 und Formin-1 sind RhoA-Effektoren, die an der Aktin-Polymerisation an AJs und der Zonula adherens (ZA) beteiligt sind und deren Stabilität begünstigen (*Grikscheit & Grosse 2016, Harris & Tepass 2010, Takeichi 2014*).

*Pollard (2007)* fasst die Wirkspektren von Forminen zusammen und beschreibt die Mechanismen Formin-induzierter Aktin-Elongation. *Kobielak et al. (2004)* zeigen, dass Formin-1  $\alpha$ -Catenin-abhängig an AJs lokalisiert ist und dort die lineare Polymerisation unvernetzter Aktinfilamente bewirkt. In MCF-7 Brustkrebszellen ist das Formin mDia1 direkt an der Organisation E-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Kontakte beteiligt (*Carramusa et al. 2007*).

Formine werden durch RhoA reguliert, eine potente RhoA-Inhibition führt zu morphologischen Membranveränderungen ähnlich der AJ-Reorganisation nach Fulvestrant-Behandlung (Abb. 4B, C). In Versuchen, die ich im Rahmen dieser Arbeit durchführte, konnte ich nahelegen, dass eine

direkte Inhibition von Forminen mittels SMIFH2 ebenfalls solche morphologischen Membranveränderungen induziert (Abb. 5A, B). Diese Effekte scheinen nicht über eine Beeinflussung von ER $\alpha$  zustande zu kommen (Abb. 5B). Die Frage bleibt bestehen, ob die Fulvestrant-induzierte AJ-Reorganisation, auch wenn sie morphologisch den Effekten der Formin-Inhibition gleicht, tatsächlich über Formine und verwandte Mechanismen vermittelt wird, oder ob mit Forminen ein unabhängiger Faktor identifiziert wurde, dessen Beeinflussung ebenfalls zu einer AJ-Reorganisation führen kann.

Somit konnte ich in dieser Arbeit Hinweise dafür sammeln, dass mit Forminen mögliche Downstream-Effektoren von RhoA in der Signalvermittlungskaskade der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation existieren.

#### **5.4.2. EGFR und RhoA: Abhängigkeiten und gegenseitige Beeinflussung**

In gesundem Brustgewebe spielt EGFR eine wichtige Rolle für Wachstum und Differenzierung. In Brustkrebszellen werden Effekte auf Proliferation, Motilität und Metastasierungspotential beschrieben. *In vitro* Studien zeigen, dass die Hemmung des EGFR-Signaling in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien die Proliferationsrate und das Invasionspotential senkt (*Eccles 2011*). EGFR-Überexpression und -Mutationen treten in vielen Brustkrebsentitäten auf und beeinflussen u.a. das Potential zur EMT. In Triple-negativem Brustkrebs (triple negative breast cancer, TNBC) und inflammatorischen Mammakarzinomen ist dieser Einfluss besonders prononciert (*Foulkes et al. 2010, Masuda et al. 2012*).

*Boerner et al. (2000)* zeigen, dass dominant-negatives RhoA in Fibroblasten die ligandenunabhängige Signalvermittlung von EGFR-Mutanten unterbindet. *Orgaz et al. 2014* fassen das Zusammenspiel von RhoA und EGFR zusammen und gehen dabei u.a. auf die Notwendigkeit des Vorhandenseins von aktivem RhoA für EGFR-vermittelte Zelltransformation ein. Amphiregulin (AREG) ist ein EGFR-Ligand, der zentralen Einfluss auf die Entwicklung von Brustgewebe hat und in vielen Krebsarten in seiner Expression verändert ist (*Berasain & Avila 2014, Busser et al. 2011*).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass die Expression von AREG in MCF-7/vBOS Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren und Behandlungen herunterreguliert ist (Abb. 5E, F). All diese Inhibitoren haben gemeinsam, dass sie morphologische Membraneffekte verursachen, die der AJ-Reorganisation nach Fulvestrant-Behandlung gleichen (vgl. *Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)*). In

Fulvestrant-behandelten Zellen ist die Expression von *AREG* ebenfalls reprimiert. Ein Knockdown von *AREG* in MCF-7/vBOS Zellen führt zur Ausprägung der o.g. morphologischen Effekte (Abb. 5H). Die Effektivität des Knockdown konnte durch methodische Limitationen dieser Arbeit allerdings nicht überprüft werden (Abb. 5I) und sollte in weitergehenden Untersuchungen unbedingt verifiziert werden.

Trotzdem lassen diese Beobachtungen die Vermutung zu, dass mit *AREG* ein weiterer möglicher Faktor in der Signalvermittlung der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation identifiziert wurde. Ein möglicher Signalweg lässt sich wie folgt postulieren: Die Behandlung von MCF-7/vBOS Zellen mit Fulvestrant bewirkt eine Repression der *AREG*-Expression und hemmt somit die autokrine EGFR-Stimulation. Dieser Mechanismus führt zu einer verminderten RhoA-Aktivierung und damit, im Zusammenspiel mit weiteren, bisher noch nicht identifizierten Faktoren, einer Assoziation von RhoA und E-Cadherin. Diese Assoziation, gemeinsam mit von *Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)* identifizierten Effekten der Fulvestrant-Behandlung auf das Zytoskelett, möglicherweise unterstützt durch eingeschränkte Formin-Aktivität, bewirkt letztlich die AJ-Reorganisation (vgl. Abb 2A, 4E, 5C, 5G).

Es ist wichtig anzumerken, dass noch keine definitiven Hinweise für das Vorliegen eines solchen Signalweges existieren und unbedingt weitere Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt werden sollten, um die hier angestellten Beobachtungen zu verifizieren und darauf aufzubauen.

## **5.5. Bedeutung der RhoA-Signalvermittlung für die Metastasierung von Mammakarzinomen**

Rho-GTPasen und verwandte Proteine kommen in allen Eukaryonten vor und wurden im Menschen erstmals in den 1980er Jahren beschrieben (*Madaule & Axel 1985*). In Brustkrebszellen scheint der Einfluss von RhoA auf das Metastasierungspotential von den spezifischen Eigenschaften der jeweiligen Tumorentität abhängig. *Ridley (2013)* beschreibt sowohl positive als auch negative Effekte einer RhoA-Depletion auf verschiedene Brustkrebszelllinien (vgl. auch *Simpson et al. 2004*). Dabei könnte u.a. ein Zusammenhang mit der notwendigen Morphologie für Invasion und metastatischem Wachstum bestehen (*Sanz-Moreno & Marshall 2010*). In der TNBC-Zelllinie TMX2-28 führt die Hemmung von RhoA mittels siRNA oder dem Inhibitor H-1152 zu einem Verlust des Invasionspotentials (*Fagan-Solis et al. 2012*).

Die Implikationen der RhoA-Signalvermittlung für Tumorprogression, -invasion und -metastasierung sind vielgestaltig (*Narumiya et al. 2009*). Die Überexpression von RhoA korreliert in hepatozellulären Karzinomen mit einer schlechten Prognose (*Li et al. 2006*). Sowohl in

Plattenepithelkarzinomen als auch in testikulären Tumoren korreliert eine RhoA-Überexpression mit Tumorprogression und schlechtem Outcome (*Faried et al. 2005, Kamai et al. 2004*).

*Ma et al. (2013)* zeigen, dass eine Überexpression von phosphoryliertem RhoA in Mammakarzinomen *in vivo* mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert ist, während *Bellizzi et al. (2008)* die RhoA-Aktivität in primären Mammatumoren und zirkulierenden Lymphozyten korrelieren und daraus Schlüsse auf die Krankheitsprogression ziehen.

*Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)* erarbeiten Ergebnisse zur Stabilität des zellulären Monolayers nach Fulvestrant-Behandlung. In Zusammenschau mit den von mir durchgeführten Versuchen zum gleichen Phänomen sowie dem Zusammenhang von Fulvestrant und RhoA-Signaling eröffnet sich die Möglichkeit, dass eine RhoA-Hemmung in MCF-7/vBOS Zellen die Zell-Zell-Adhäsion stärkt und das Metastasierungspotential senkt. Eine Hemmung von RhoA mittels siRNA hemmt die Invasionsfähigkeit und Proliferation von MDA-MB231 Brustkrebszellen *in vitro* und *in vivo* (*Pillé et al. 2005, vgl. auch Pillé et al. 2006*).

Die RhoA-Signalvermittlung erscheint als mögliches Ziel neuer, zielgerichteter Tumorthérapien. Außerdem scheint es von großer Bedeutung, den Effekt bereits bestehender Therapien, wie etwa von Antiöstrogenen, auf die RhoA-Signalvermittlung zu verstehen, um Implikationen für Progression, Invasion und Metastasierung abzuleiten. Die vorliegende Arbeit leistet dazu einen Beitrag, auf dem es in folgenden Untersuchungen aufzubauen gilt.

## **5.6. Implikationen für die Therapie von Mammakarzinomen und Schlussfolgerung**

Der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  ist ein wichtiges Zielprotein in der Therapie Hormonrezeptor-positiver Mammakarzinome. Antiöstrogene wie Tamoxifen und Aromataseinhibitoren wie Anastrozol sind fester Bestandteil der adjuvanten hormonellen Brustkrebstherapie (*vgl. etwa Senkus et al. 2015*).

Eine gefürchtete Eigenschaft von malignen Tumoren ist ihre Fähigkeit zur Adaptation an Chemotherapie-Regime mit der letztlichen Konsequenz einer Therapieresistenz (*vgl. Nicolantonio et al. 2005*). Auch für die antihormonelle Therapie von Mammakarzinomen werden Resistenzen und Therapieversagen beschrieben (*Clarke et al 2003, Schiff et al. 2003, Sommer & Fuqua 2001*).

Ein genaues Verständnis derjenigen Mechanismen, über die Antiöstrogene ihre Effekte auf Mammakarzinomzellen vermitteln, scheint also unerlässlich, um die Therapie-Antwort (response) einzuschätzen und Fragen bezüglich der Ursachen eines möglichen Therapieversagens bzw. eines Progress unter Therapie zu beantworten.

In dieser Arbeit konnte ich RhoA-Signaling als möglichen Downstream-Effektor ER $\alpha$ -vermittelter Prozesse identifizieren (Abb. 3B, E, 4B, C). In Mammakarzinomzelllinien sind bezüglich Proliferation und Metastasierung sowohl positive als auch negative Effekte einer RhoA-Depletion beschrieben (siehe 4.5.). Im Sinne der individualisierten Tumorthherapie kann eine Bestimmung des Ansprechens eines spezifischen Tumors auf potente RhoA-Hemmung und des Einflusses von Antiöstrogenen auf die räumlich-zeitliche RhoA-Aktivierung *in vitro*, gerade in Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen, in der Zukunft möglicherweise Hinweise auf die Effektivität einer antiöstrogenen Therapie geben. Möglicherweise kann es gelingen, auch Korrelationen zwischen RhoA-Status und der Antwort auf antiöstrogene Therapien aufzuzeigen.

In dieser Arbeit zeige ich außerdem, wie manche Brustkrebszelllinien auf eine Fulvestrant-Behandlung mit einer AJ-Reorganisation reagieren, während andere keine morphologischen Effekte ausprägen (Abb. 1E). Sollten die von *Bischoff, Kornhuber et al. (Manuskript und Patent eingereicht)* postulierten Implikationen der Fulvestrant-Behandlung auf das Metastasierungspotential der Zellen zutreffen, so ist die Reaktion (im Sinne der AJ-Reorganisation) kultivierter Tumorzellen auf Fulvestrant-Behandlung *in vitro* ein möglicher Marker, auch das Therapieansprechen *in vivo*, insbesondere im Hinblick auf die Verhinderung einer Metastasierung, vorherzusagen.

In meiner Arbeit konnte ich Hinweise dafür sammeln, dass über Beeinflussung des EGFR-Signaling ebenfalls eine AJ-Reorganisation zu beobachten ist (Abb. 5), mit ähnlichen möglichen Implikationen für das Metastasierungspotential der Zellpopulation. HER-2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) ist ein bekanntes und etabliertes Therapieziel in der Behandlung von Mammakarzinomen (*Higgins & Baselga 2011, Ross et al. 2009*). Ein cross-talk zwischen ER $\alpha$  und HER-2/neu ist beschrieben und möglicherweise an der Tamoxifen-Resistenz einiger Mammakarzinomentitäten beteiligt (*Shou et al. 2004*). Die gegenseitige Beeinflussung von antiöstrogenen Therapie und EGFR-Hemmung hat direkte Implikationen für die response von Mammatumoren auf bestimmte Therapie-Regime. Ein besseres Verständnis dieses Zusammenspiels kann somit einen Beitrag zur Entwicklung neuer, effektiver und sicherer Tumortherapien leisten.

Ich konnte in dieser Arbeit einige mögliche intrazelluläre Mechanismen identifizieren, über die eine Fulvestrant-Behandlung in MCF-7/vBOS Zellen zu einer AJ-Reorganisation führt. Fulvestrant bewirkt eine Repression der *AREG*-Expression und hemmt somit wahrscheinlich die

autokrine EGFR-Stimulation. Über diesen Mechanismus kommt es wohlmöglich zu einer verminderten RhoA-Aktivierung und damit, im Zusammenspiel mit weiteren, bisher noch nicht identifizierten Faktoren, einer Assoziation von RhoA und E-Cadherin. Diese Assoziation, möglicherweise unterstützt durch eingeschränkte Formin-Aktivität, ist möglicherweise für die AJ-Reorganisation wesentlich.

Diese Arbeit kann als Anregung für weitere Forschung dienen, diese Mechanismen genauer zu charakterisieren und ihre Rolle in der Fulvestrant-induzierten AJ-Reorganisation zu festigen. Ein Verständnis dieser Mechanismen wird in Zukunft dabei helfen, noch spezifischere Tumorthérapien zu entwickeln und die Wirkungen und Limitationen existierender Therapien besser zu verstehen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Ali, S., & Coombes, R. C. (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature Reviews Cancer*, 2(2), 101-112.
- 2 Amano, M., Nakayama, M., & Kaibuchi, K. (2010). Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton*, 67(9), 545-554.
- 3 Andrews, J. L., Kim, A. C., & Hens, J. R. (2012). The role and function of cadherins in the mammary gland. *Breast cancer research*, 14(1), 1-10.
- 4 Ariake, K., Ohtsuka, H., Motoi, F., Douchi, D., Oikawa, M., Rikiyama, T., Fukase, T., Katayose, Y., Egawa S., and Unno, M. (2012). GCF2/LRRFIP1 promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin-dependent RhoA activation. *Cancer letters*, 325(1), 99-107.
- 5 Asgeirsson, K. S., Jónasson, J. G., Tryggvadóttir, L., Olafsdóttir, K., Sigurgeirsdóttir, J. R., Ingvarsson, S., & Ögmundsdóttir, H. M. (2000). Altered expression of E-cadherin in breast cancer: patterns, mechanisms and clinical significance. *European Journal of Cancer*, 36(9), 1098-1106.
- 6 Ayollo, D. V., Zhitnyak, I. Y., Vasiliev, J. M., & Gloushankova, N. A. (2009). Rearrangements of the actin cytoskeleton and E-cadherin-based adherens junctions caused by neoplastic transformation change cell-cell interactions. *PloS one*, 4(11).
- 7 Aznar, S., Fernández-Valerón, P., Espina, C., & Lacal, J. C. (2004). Rho GTPases: potential candidates for anticancer therapy. *Cancer letters*, 206(2), 181-191.
- 8 Baranwal, S., & Alahari, S. K. (2009). Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 384(1), 6-11.
- 9 Bellizzi, A., Mangia, A., Chiriatti, A., Petroni, S., Quaranta, M., Schittulli, F., Malfettone, A., Cardona, R. A., Paradiso, A., and Reshkin, S. J. (2008). RhoA protein expression in primary breast cancers and matched lymphocytes is associated with progression of the disease. *International journal of molecular medicine*, 22(1), 25-31.
- 10 Berasain, C., & Avila, M. A. (2014, April). Amphiregulin. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 28, pp. 31-41). Academic Press.
- 11 Bhatt, T., Rizvi, A., Batta, S. P. R., Kataria, S., & Jamora, C. (2013). Signaling and mechanical roles of E-cadherin. *Cell communication & adhesion*, 20(6), 189-199.

- 12 Bischoff, P. (2019). Alterations at the cell membrane of breast cancer cells by estrogens and antiestrogens.
- 13 Bischoff, P., Kornhuber, M., Dunst, S., Zell, J., Fauler, B., Mielke, T., Taubenberger, A., Guck, J., Oelgeschläger, M., Schoenfelder, G. ER alpha signaling controls adherens junction organization and stability in human breast cancer cells through regulation of AREG/EGFR but independent of E-Cadherin. Manuscript under review. Europäische Patentanmeldung (EP 3517967 A1): <https://data.epo.org/gpi/EP3517967A1>; Internationale PCT-Patentanmeldung (WO 2019145517 A1): <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO201914551>
- 14 Blaschuk, O. W., & Devemy, E. (2009). Cadherins as novel targets for anti-cancer therapy. *European journal of pharmacology*, 625(1-3), 195-198.
- 15 Boerner, J. L., Danielsen, A., McManus, M. J., & Maihle, N. J. (2001). Activation of Rho is required for ligand-independent oncogenic signaling by a mutant epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3691-3695.
- 16 Bos, J. L., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129(5), 865-877.
- 17 Bouris, P., Skandalis, S. S., Piperigkou, Z., Afratis, N., Karamanou, K., Aletras, A. J., ... & Karamanos, N. K. (2015). Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. *Matrix Biology*, 43, 42-60.
- 18 Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A., & Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(2), 128.
- 19 Braga, V. (2000). Epithelial cell shape: cadherins and small GTPases. *Experimental cell research*, 261(1), 83-90.
- 20 Busser, B., Sancey, L., Brambilla, E., Coll, J. L., & Hurbin, A. (2011). The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1816(2), 119-131.
- 21 Bustelo, X. R., Sauzeau, V., & Berenjano, I. M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions *in vivo*. *Bioessays*, 29(4), 356-370.
- 22 Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61.
- 23 Carramusa, L., Ballestrem, C., Zilberman, Y., & Bershadsky, A. D. (2007). Mammalian diaphanous-related formin Dial controls the organization of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. *Journal of cell science*, 120(21), 3870-3882.

- 24 Chao, Y. L., Shepard, C. R., & Wells, A. (2010). Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Molecular cancer*, 9(1), 179.
- 25 Ciobanasu, C., Faivre, B., & Le Clainche, C. (2012). Actin dynamics associated with focal adhesions. *International journal of cell biology*, 2012.
- 26 Citi, S., Guerrero, D., Spadaro, D., & Shah, J. (2014). Epithelial junctions and Rho family GTPases: the zonular signalosome. *Small GTPases*, 5(4), e973760.
- 27 Clarke, R. B., Howell, A., Potten, C. S., & Anderson, E. (1997). Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer research*, 57(22), 4987-4991.
- 28 Clarke, R., Liu, M. C., Bouker, K. B., Gu, Z., Lee, R. Y., Zhu, Y., Skaar, T. C., Gomez, B., O'Brien, K., Wang, Y., and Hilakivi-Clarke, L. A. (2003). Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*, 22(47), 7316-7339.
- 29 De Beco, S., Gueudry, C., Amblard, F., & Coscoy, S. (2009). Endocytosis is required for E-Cadherin redistribution at mature adherens junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), 7010-7015.
- 30 De Beco, S., Perney, J. B., Coscoy, S., & Amblard, F. (2015). Mechanosensitive adaptation of E-cadherin turnover across adherens junctions. *PLoS one*, 10(6).
- 31 de Curtis, I., & Meldolesi, J. (2012). Cell surface dynamics—how Rho GTPases orchestrate the interplay between the plasma membrane and the cortical cytoskeleton. *Journal of cell science*, 125(19), 4435-4444.
- 32 Di Nicolantonio, F., Mercer, S. J., Knight, L. A., Gabriel, F. G., Whitehouse, P. A., Sharma, S., Fernando, A., Glaysher, S., Di Palma, S., Johnson, P., Somers, S. S., Toh, S., Higgins, B., Lamont, A., Gulliford, T., Hurren, J., Yiangou, C., and Cree, I. A. (2005). Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC cancer*, 5(1), 78.
- 33 Eccles, S. A. (2011). The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *The International journal of developmental biology*, 55(7-9), 685-696.
- 34 El-Sibai, M., Pertz, O., Pang, H., Yip, S. C., Lorenz, M., Symons, M., Condeelis, J. S., Hahn, K. M., and Backer, J. M. (2008). RhoA/ROCK-mediated switching between Cdc42- and Rac1-dependent protrusion in MTLn3 carcinoma cells. *Experimental cell research*, 314(7), 1540-1552.

- 35 Elloul, S., Bukholt Elstrand, M., Nesland, J. M., Tropé, C. G., Kvalheim, G., Goldberg, I., Reich, R., and Davidson, B. (2005). Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 103(8), 1631-1643.
- 36 Elzagheid, A., Kuopio, T., Ilmen, M., & Collan, Y. (2002). Prognostication of invasive ductal breast cancer by quantification of E-cadherin immunostaining: the methodology and clinical relevance. *Histopathology*, 41(2), 127-133.
- 37 Evers, E. E., Zondag, G. C. M., Malliri, A., Price, L. S., Ten Klooster, J. P., Van Der Kammen, R. A., & Collard, J. G. (2000). Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *European journal of cancer*, 36(10), 1269-1274.
- 38 Fagan-Solis, K. D., Schneider, S. S., Pentecost, B. T., Bentley, B. A., Otis, C. N., Gierthy, J. F., & Arcaro, K. F. (2013). The RhoA pathway mediates MMP-2 and MMP-9-independent invasive behavior in a triple-negative breast cancer cell line. *Journal of cellular biochemistry*, 114(6), 1385-1394.
- 39 Faried, A., Nakajima, M., Sohda, M., Miyazaki, T., Kato, H., & Kuwano, H. (2005). Correlation between RhoA overexpression and tumour progression in esophageal squamous cell carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 31(4), 410-414.
- 40 Fearon, E. R. (2003). Connecting estrogen receptor function, transcriptional repression, and E-cadherin expression in breast cancer. *Cancer cell*, 3(4), 307-310.
- 41 Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
- 42 Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *New England journal of medicine*, 363(20), 1938-1948.
- 43 Gillett, C. E., Miles, D. W., Ryder, K., Skilton, D., Liebman, R. D., Springall, R. J., Barnes, D. M., and Hanby, A. M. (2001). Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. *The Journal of pathology*, 193(4), 433-441.
- 44 Giretti, M. S., Fu, X. D., De Rosa, G., Sarotto, I., Baldacci, C., Garibaldi, S., Manella, P., Biglia, N., Sisoni, P., Genazzani, A. R., and Simoncini, T. (2008). Extra-nuclear signalling of estrogen receptor to breast cancer cytoskeletal remodelling, migration and invasion. *PloS one*, 3(5).

- 45 Grikscheit, K., & Grosse, R. (2016). Formins at the Junction. *Trends in biochemical sciences*, 41(2), 148-159.
- 46 Gulhati, P., Bowen, K. A., Liu, J., Stevens, P. D., Rychahou, P. G., Chen, M., Lee, E. Y., Weiss, H. L., O'Connor, K. L., Gao, T. and Evers, B. M. (2011). mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer research*, 71(9), 3246-3256.
- 47 Harris, T. J., & Tepass, U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(7), 502.
- 48 Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(3), 660-669.
- 49 Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews*, 87(3), 905-931.
- 50 Hennig, G., Behrens, J., Truss, M., Frisch, S., Reichmann, E., & Birchmeier, W. (1995). Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter *in vivo*. *Oncogene*, 11(3), 475-484.
- 51 Higgins, M. J., & Baselga, J. (2011). Targeted therapies for breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, 121(10), 3797-3803.
- 52 Hiraguri, S., Godfrey, T., Nakamura, H., Graff, J., Collins, C., Shayesteh, L., Doggett, N., Johnson, K., Wheelock, M., Herman, J., Baylin, S., Pinkel, D., and Gray, J. (1998). Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines. *Cancer Research*, 58(9), 1972-1977.
- 53 Huang, B., Omoto, Y., Iwase, H., Yamashita, H., Toyama, T., Coombes, R. C., Filipovic, A., Warner, M., and Gustafsson, J. Å. (2014). Differential expression of estrogen receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ 1, and  $\beta$ 2 in lobular and ductal breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(5), 1933-1938.
- 54 Huet, G., Mérot, Y., Le Dily, F., Kern, L., Ferrière, F., Saligaut, C., Boujrad, N., Pakdel, F., Métivier, R., and Flouriot, G. (2008). Loss of E-cadherin-mediated cell contacts reduces estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) transcriptional efficiency by affecting the respective contribution exerted by AF1 and AF2 transactivation functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 365(2), 304-309.
- 55 Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 247-269.

- 56 Jordan, V. C. (2003). Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nature reviews Drug discovery*, 2(3), 205-213.
- 57 Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428.
- 58 Kamai, T., Yamanishi, T., Shirataki, H., Takagi, K., Asami, H., Ito, Y., & Yoshida, K. I. (2004). Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clinical cancer research*, 10(14), 4799-4805.
- 59 Khalil, A. A., Ilina, O., Gritsenko, P. G., Bult, P., Span, P. N., & Friedl, P. (2017). Collective invasion in ductal and lobular breast cancer associates with distant metastasis. *Clinical & experimental metastasis*, 34(6-7), 421-429.
- 60 Kim, H. C., Jo, Y. J., Kim, N. H., & Namgoong, S. (2015). Small molecule inhibitor of formin homology 2 domains (SMIFH2) reveals the roles of the formin family of proteins in spindle assembly and asymmetric division in mouse oocytes. *PloS one*, 10(4).
- 61 Knights, A. J., Funnell, A. P., Crossley, M., & Pearson, R. C. (2012). Holding tight: cell junctions and cancer spread. *Trends in cancer research*, 8, 61.
- 62 Kobayashi, N., Ikesue, A., Majumdar, S., & Siahaan, T. J. (2006). Inhibition of e-cadherin-mediated homotypic adhesion of Caco-2 cells: a novel evaluation assay for peptide activities in modulating cell-cell adhesion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(1), 309-316.
- 63 Kobiela, A., Pasolli, H. A., & Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nature cell biology*, 6(1), 21-30.
- 64 Kourtidis, A., Ngok, S. P., & Anastasiadis, P. Z. (2013). p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 116, pp. 409-432). Academic Press.
- 65 Kowalski, P. J., Rubin, M. A., & Kleer, C. G. (2003). E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast cancer research*, 5(6), R217.
- 66 Kreienberg, R., Albert, U. S., Follmann, M., Kopp, I. B., Kühn, T., & Wöckel, A. (2013). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. *Senologie-Zeitschrift für Mammadiagnostik und-therapie*, 10(03), 164-192.

- 67 Larive, R. M., Abad, A., Cardaba, C. M., Hernández, T., Cañamero, M., de Álava, E., Santos, E., Alarcón, B., and Bustelo, X. R. (2012). The Ras-like protein R-Ras2/TC21 is important for proper mammary gland development. *Molecular biology of the cell*, 23(12), 2373-2387.
- 68 Lei, R., Tang, J., Zhuang, X., Deng, R., Li, G., Yu, J., Liang, Y., Xiao, J., Wang, H. Y., Yang, Q., and Hu, G. (2014). Suppression of MIM by microRNA-182 activates RhoA and promotes breast cancer metastasis. *Oncogene*, 33(10), 1287-1296.
- 69 Li, C. I., Anderson, B. O., Daling, J. R., & Moe, R. E. (2003). Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *Jama*, 289(11), 1421-1424.
- 70 Li, C. I., Uribe, D. J., & Daling, J. R. (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British journal of cancer*, 93(9), 1046-1052.
- 71 Li, M. A., Liu, Y. P., Zhang, X. H., Geng, C. Z., & LI, Z. H. (2013). Relationship of RhoA signaling activity with ezrin expression and its significance in the prognosis for breast cancer patients. *Chinese medical journal*, 126(2), 242-247.
- 72 Li, X. R., Ji, F., Ouyang, J., Wu, W., Qian, L. Y., & Yang, K. Y. (2006). Overexpression of RhoA is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 32(10), 1130-1134.
- 73 Madaule, P., & Axel, R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell*, 41(1), 31-40.
- 74 Mahler-Araujo, B., Savage, K., Parry, S., & Reis-Filho, J. S. (2008). Reduction of E-cadherin expression is associated with non-lobular breast carcinomas of basal-like and triple negative phenotype. *Journal of clinical pathology*, 61(5), 615-620.
- 75 Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*, 10(10), 955-960.
- 76 Malissein, E., Meunier, E., Lajoie-Mazenc, I., Médale-Giamarchi, C., Dalenc, F., & Doisneau-Sixou, S. F. (2013). RhoA and RhoC differentially modulate estrogen receptor  $\alpha$  recruitment, transcriptional activities, and expression in breast cancer cells (MCF-7). *Journal of cancer research and clinical oncology*, 139(12), 2079-2088.
- 77 Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G. N., & Ueno, N. T. (2012). Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 136(2), 331-345.
- 78 Meng, W., & Takeichi, M. (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a002899.

- 79 Nair, S., & Sachdeva, G. (2018). Estrogen matters in metastasis. *Steroids*, 138, 108-116.
- 80 Narumiya, S., Tanji, M., & Ishizaki, T. (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2), 65-76.
- 81 Nass, S. J., Herman, J. G., Gabrielson, E., Iversen, P. W., Parl, F. F., Davidson, N. E., & Graff, J. R. (2000). Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer research*, 60(16), 4346-4348.
- 82 Nelson, W. J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 2), 149-155.
- 83 O'Connor, K., & Chen, M. (2013). Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases*, 4(3), 141-147.
- 84 Oesterreich, S., Deng, W., Jiang, S., Cui, X., Ivanova, M., Schiff, R., Kang, K., Hadsell, D. L., Behrens, J., and Lee, A. V. (2003). Estrogen-mediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. *Cancer research*, 63(17), 5203-5208.
- 85 Orgaz, J. L., Herraiz, C., & Sanz-Moreno, V. (2014). Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases*, 5(4), e983867.
- 86 Oviedo, P. J., Sobrino, A., Laguna-Fernandez, A., Novella, S., Tarín, J. J., García-Pérez, M. A., Sanchís, J., Cano, A., and Hermenegildo, C. (2011). Estradiol induces endothelial cell migration and proliferation through estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK pathway. *Molecular and cellular endocrinology*, 335(2), 96-103.
- 87 Parsons, J. T., Horwitz, A. R., & Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(9), 633-643.
- 88 Pedersen, K. B., Nesland, J. M., Fodstad, Ø., & Mælandsmo, G. M. (2002). Expression of S100A4, E-cadherin,  $\alpha$ - and  $\beta$ -catenin in breast cancer biopsies. *British journal of cancer*, 87(11), 1281-1286.
- 89 Pertz, O. (2010). Spatio-temporal Rho GTPase signaling—where are we now?. *Journal of cell science*, 123(11), 1841-1850.
- 90 Pillé, J. Y., Denoyelle, C., Varet, J., Bertrand, J. R., Soria, J., Opolon, P., Lu, H., Pritchard, L. L., Vannier, J. P., Malvy, C., Soria, C., and Li, H. (2005). Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Molecular therapy*, 11(2), 267-274.

- 91 Pillé, J. Y., Li, H., Blot, E., Bertrand, J. R., Pritchard, L. L., Opolon, P., Maksimenko, A., Lu, H., Vannier, J. P., Soria, J., Malvy, C., and Soria, C. (2006). Intravenous delivery of anti-RhoA small interfering RNA loaded in nanoparticles of chitosan in mice: safety and efficacy in xenografted aggressive breast cancer. *Human gene therapy*, 17(10), 1019-1026.
- 92 Platet, N., Cathiard, A. M., Gleizes, M., & Garcia, M. (2004). Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Critical reviews in oncology/hematology*, 51(1), 55-67.
- 93 Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36, 451-477.
- 94 Priya, R., Gomez, G. A., Budnar, S., Verma, S., Cox, H. L., Hamilton, N. A., & Yap, A. S. (2015). Feedback regulation through myosin II confers robustness on RhoA signalling at E-cadherin junctions. *Nature cell biology*, 17(10), 1282-1293.
- 95 Ratheesh, A., Gomez, G. A., Priya, R., Verma, S., Kovacs, E. M., Jiang, K., Brown, N. H., Akhmanova, A., Stehbens, S. J., and Yap, A. S. (2012). Centralspindlin and  $\alpha$ -catenin regulate Rho signalling at the epithelial zonula adherens. *Nature cell biology*, 14(8), 818-828.
- 96 Ridley, A. J. (2013). RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *Journal of microscopy*, 251(3), 242-249.
- 97 Ridley, A. J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Current opinion in cell biology*, 36, 103-112.
- 98 Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D., & Morrow, J. S. (1995). Alpha 1 (E)-catenin is an actin-binding and-bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8813-8817.
- 99 Robertson, J. F., Osborne, C. K., Howell, A., Jones, S. E., Mauriac, L., Ellis, M., Kleeberg, U. R., Come, S. E., Vergote, I., Gertler, S., Buzdar, A., Webster, A., and Morris, C. (2003). Fulvestrant versus anastrozole for the treatment of advanced breast carcinoma in postmenopausal women: a prospective combined analysis of two multicenter trials. *Cancer*, 98(2), 229-238.
- 100 Ross, J. S., Schenkein, D. P., Pietrusko, R., Rolfe, M., Linette, G. P., Stec, J., Stagliano, N. E., Ginsburg, G. S., Symmans, W. F., Pusztai, L., and Hortobagyi, G. N. (2004). Targeted therapies for cancer 2004. *American journal of clinical pathology*, 122(4), 598-609.

- 101 Ross, J. S., Slodkowska, E. A., & Symmans, W. F. (2016). The HER-2 receptor and breast cancer: Ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine (vol 14, pg 320, 2009). *ONCOLOGIST*, 21(3), 392-392.
- 102 Rugo, H. S., Rumble, R. B., Macrae, E., Barton, D. L., Connolly, H. K., Dickler, M. N., Fallowfield, L., Fowble, B., Ingle, J. N., Jahanzeb, M., Johnston, S. R. D., Korde, L. A., Khatcheressian, J. L., Mehta, R. S., Muss, H. B., and Burstein, H. J. (2016). Endocrine therapy for hormone receptor-positive metastatic breast cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 34(25), 3069-3103.
- 103 Russo, J., Ao, X., Grill, C., & Russo, I. H. (1999). Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast cancer research and treatment*, 53(3), 217-227.
- 104 Sanz-Moreno, V., & Marshall, C. J. (2010). The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Current opinion in cell biology*, 22(5), 690-696.
- 105 Schiff, R., Massarweh, S., Shou, J., & Osborne, C. K. (2003). Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clinical Cancer Research*, 9(1), 447s-454s.
- 106 Schnitt, S. J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology*, 23(2), S60-S64.
- 107 Scott, S. M., Brown, M., & Come, S. E. (2011). Emerging data on the efficacy and safety of fulvestrant, a unique antiestrogen therapy for advanced breast cancer. *Expert opinion on drug safety*, 10(5), 819-826.
- 108 Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., Zackrisson, S. and Cardoso, F. (2015). Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*, 26(suppl\_5), v8-v30.
- 109 Shang, X., Marchioni, F., Evelyn, C. R., Sipes, N., Zhou, X., Seibel, W., Wortman, M., and Zheng, Y. (2013). Small-molecule inhibitors targeting G-protein-coupled Rho guanine nucleotide exchange factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), 3155-3160.
- 110 Shang, X., Marchioni, F., Sipes, N., Evelyn, C. R., Jerabek-Willemsen, M., Duhr, S., Seibel, W., Wortman, M., and Zheng, Y. (2012). Rational design of small molecule inhibitors targeting RhoA subfamily Rho GTPases. *Chemistry & biology*, 19(6), 699-710.
- 111 Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., & Greene, G. L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95(7), 927-937.

- 112 Shou, J., Massarweh, S., Osborne, C. K., Wakeling, A. E., Ali, S., Weiss, H., & Schiff, R. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(12), 926-935.
- 113 Simpson, K. J., Dugan, A. S., & Mercurio, A. M. (2004). Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma. *Cancer research*, 64(23), 8694-8701.
- 114 Sit, S. T., & Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*, 124(5), 679-683.
- 115 Sommer, S., & Fuqua, S. A. (2001, October). Estrogen receptor and breast cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 11, No. 5, pp. 339-352). Academic Press.
- 116 Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the national cancer institute*, 51(5), 1409-1416.
- 117 Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(6), 397-410.
- 118 Tan, R., Wang, L., Song, J., Li, J., & He, T. (2017). Expression and significance of Twist, estrogen receptor, and E-cadherin in human breast cancer cells and tissues. *Journal of cancer research and therapeutics*, 13(4), 707.
- 119 Van Velthuysen, M. L., Taal, B. G., Van der Hoeven, J. J. M., & Peterse, J. L. (2005). Expression of oestrogen receptor and loss of E-cadherin are diagnostic for gastric metastasis of breast carcinoma. *Histopathology*, 46(2), 153-157.
- 120 Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J. H., & Raman, V. (2008). Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 367(2), 235-241.
- 121 Wagner, E., & Glotzer, M. (2016). Local RhoA activation induces cytokinetic furrows independent of spindle position and cell cycle stage. *Journal of Cell Biology*, 213(6), 641-649.
- 122 Warner, H., Wilson, B. J., & Caswell, P. T. (2019). Control of adhesion and protrusion in cell migration by Rho GTPases. *Current opinion in cell biology*, 56, 64-70.
- 123 Wheelock, M. J., Soler, A. P., & Knudsen, K. A. (2001). Cadherin junctions in mammary tumors. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 6(3), 275-285.

- 124 Wild, C. (2020). World cancer report 2020 (pp. 482-494). C. P. Wild, & B. W. Stewart (Eds.). Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- 125 Wu, Y., Kanchanawong, P., & Zaidel-Bar, R. (2015). Actin-delimited adhesion-independent clustering of E-cadherin forms the nanoscale building blocks of adherens junctions. *Developmental cell*, 32(2), 139-154.
- 126 Yao, L., Romero, M. J., Toque, H. A., Yang, G., Caldwell, R. B., & Caldwell, R. W. (2010). The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction. *Journal of cardiovascular disease research*, 1(4), 165.
- 127 Ye, Y., Xiao, Y., Wang, W., Yearsley, K., Gao, J. X., Shetuni, B., & Barsky, S. H. (2010). ER $\alpha$  signaling through slug regulates E-cadherin and EMT. *Oncogene*, 29(10), 1451.
- 128 Young, K. G., & Copeland, J. W. (2010). Formins in cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(2), 183-190.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jakob Tobias Zell, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Zelluläre Mechanismen der Fulvestrant-induzierten Reorganisation von Adherens Junctions in Brustkrebszellen (Cellular mechanisms of Fulvestrant-induced reorganization of adherens junctions in breast cancer cells) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

04.03.2021

Datum

Jakob Tobias Zell

Unterschrift

## **Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.





## **Danksagung**

Mein erster und besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Gilbert Schönfelder, für seine Geduld, Inspiration, für konstruktive Anregungen, Unterstützung und für seine helfende Hand, die die vorliegende Arbeit in dieser Form ermöglicht hat.

Auch Dr. Sebastian Dunst, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, sei an dieser Stelle hervorgehoben gedankt.

Ferner möchte ich mich bei dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und allen seinen Mitarbeitern bedanken. In diesem Rahmen vielen Dank an Dorothe Storm für die Unterstützung im Labor, vielen Dank an Dr. Michael Oelgeschläger, an Philip Bischoff, an Johanna Ndikung und Marja Kornhuber, die mich stets unterstützten.

Ebenso möchte ich mich bei allen externen Kooperationspartnern bedanken, die Daten und Unterstützung für diese Arbeit und andere Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe bereitgestellt haben.

Vielen Dank an meine Eltern Jürgen Sausele und Ingrid Zell, für Beistand, Unterstützung und natürlich für das Korrekturlesen. Vielen Dank an meinen Bruder Jonas Zell für seinen Beistand und an Luise Ciesla für ihr offenes Ohr und ihre helfende Hand.