

**Regulation der Expression des  
Tumorinvasionssuppressors Visinin-like Protein 1 (VILIP-1)  
und seine Bedeutung für das Metastasierungspotential von  
Plattenepithelkarzinomzellen**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplombiologin Katharina Schönraht (geb. Boeck)  
aus Dresden

Juni 2009

Die vorgelegte Arbeit wurde von November 2004 bis März 2009 am Institut für Physiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin in der Arbeitsgruppe Signaltransduktion unter Leitung von Prof. Dr. Karl-Heinz Braunewell angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Braunewell
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke

Disputation am 01.12.09

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Braunewell gilt besonderer Dank dafür, dass er mir ermöglicht hat an diesem interessanten Projekt zu arbeiten, für die umfassende Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft sowie für die Unterstützung während der Anfertigung meiner Dissertation.

Prof. Dr. Uwe Heinemann danke ich für die Ermöglichung und Unterstützung meiner Forschungstätigkeit am Institut für Neurophysiologie der Charité und für wertvolle Ratschläge.

Der Arbeitsgruppe Signaltransduktion sei gedankt für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die bereichernden Diskussionen und Gespräche. Ich danke besonders Dr. Marian Brackmann für viele hilfreiche Ratschläge und die methodische Einführung, Dr. Congjian Zhao für die Hilfe bei technischen und computertechnischen Problemen und Cornelia Noack für die freundliche Unterstützung und ihr Engagement bei allen organisatorischen Angelegenheiten.

Des Weiteren gilt mein Dank Freunden und Familie für ihre Begleitung und Unterstützung und besonders meinem Mann, Dr. Felix Schönraht, für sein unbegrenztes Verständnis und die vielen hilfreichen Gespräche und Diskussionen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Zusammenfassung/Abstract.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einführung in die Thematik.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Charakteristik maligner Tumorerkrankungen.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Tumorgenese.....	3
2.1.2 Metastasierung und Metastasierungssuppressoren.....	4
2.1.3 Signalkaskaden mit Einfluss auf die Tumorprogression.....	8
2.1.3.1 Signalwege der Botenstoffe cAMP und cGMP.....	8
2.1.3.2 Tyrosinkinaserzeptoren und nachgeschaltete Signalkaskaden.....	9
2.1.3.3 Signaltransduktion des TGF $\beta$ -Signals.....	12
<b>2.2 Das neuronale Kalziumsensorprotein VILIP-1.....</b>	<b>12</b>
2.2.1 Intrazelluläre neuronale Kalziumsensoren (NCS).....	12
2.2.2 Visinin-like protein 1 (VILIP -1).....	17
2.2.2.1 Allgemeine Charakterisierung von VILIP-1.....	17
2.2.2.2 VILIP-1 als Tumorinvasionssuppressor.....	20
<b>2.3 Fragestellung.....</b>	<b>21</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>22</b>
3.1.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	22
3.1.2 Allgemeine Materialien für die Zellkultur.....	23
3.1.3 Effektoren und Inhibitoren.....	24
3.1.4 Antikörper.....	24
3.1.5 Oligonukleotide und Vektoren.....	26
3.1.6 Zellkulturmodell.....	27
<b>3.2 Methoden.....</b>	<b>28</b>
3.2.1 Kultivierung der Tumorzelllinien.....	28
3.2.2 Transiente Transfektion.....	28
3.2.3 Bestimmung der intrazellulären cAMP bzw. cGMP Konzentration.....	29
3.2.4 Zell-Matrix-Adhäsionstest.....	29
3.2.5 Zell-Dissoziationsmessung.....	30

3.2.6	In-vitro-Analyse der Zell-Migration .....	30
3.2.7	Immunzytochemie und Fluoreszenzintensitätsmessung .....	31
3.2.8	Western Blot Analyse .....	32
3.2.9	Reverse-Transkriptase-PCR und Agarosegelelektrophorese .....	34
3.2.10	Bioinformatische Promotoranalyse .....	35
3.2.11	Statistische Analyse .....	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Modulation der VILIP-1-Expression .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Bedeutung cAMP- und cGMP-abhängiger Signalwege für das Metastasierungspotential von SCC-Zellen .....</b>	<b>37</b>
4.2.1	Messung der Konzentration intrazellulärer zyklischer Nukleotide .....	37
4.2.2	Analyse der Zell-Matrixadhäsion.....	39
4.2.3	Modulation des Dissoziationsverhaltens der SCC-Zellen.....	40
4.2.4	Untersuchung des Migrationsverhaltens der SCC-Zellen.....	41
4.2.5	Dissoziation in Abhängigkeit von VILIP-1 .....	43
4.2.6	Migrationsvermögen in Abhängigkeit von VILIP-1 .....	45
4.2.7	Analyse der Expression der partikulären Guanylatzyklasen .....	46
4.2.8	Analyse der Expression der Adenylatzyklase-Isoformen .....	47
4.2.9	Subzelluläre Lokalisierung der Adenylatzyklasen .....	49
<b>4.3</b>	<b>Untersuchungen zur Rolle von VILIP-1 bei der Tumorprogression.....</b>	<b>51</b>
4.3.1	Profil der Hauttumorzelllinien.....	51
4.3.2	Auswirkungen der Stimulation mit den Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ und EGF .....	52
4.3.3	Regulation der Expression von Integrin $\alpha$ 5 und E-Cadherin.....	53
4.3.4	Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors snail-1 .....	55
4.3.5	Dissoziationsverhalten der SCC-Zellen nach EGF-Stimulation .....	58
4.3.6	Auswirkungen der EGF-Stimulation in Migrationsanalysen.....	60
4.3.7	Beeinflussung des Migrationsverhaltens durch Kinaseinhibitoren .....	61
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>Bedeutung cAMP- und cGMP-abhängiger Signalwege für das Metastasierungspotential von SCC-Zellen.....</b>	<b>63</b>
5.1.1	Messung der Konzentration intrazellulärer zyklischer Nukleotide .....	63

5.1.2	Zelladhäsion, -dissoziation und -migration in Abhängigkeit vom intrazellulären cAMP- beziehungsweise cGMP-Spiegel .....	64
5.1.3	Zelldissoziation und -migration in Abhängigkeit von VILIP-1 .....	67
5.1.4	Expression der partikulären Guanylatzyklen.....	68
5.1.5	Expression und Lokalisierung der Adenylatzyklase-Isoformen.....	69
5.1.6	Fazit .....	71
<b>5.2</b>	<b>Untersuchungen zur Rolle von VILIP-1 bei der Tumorprogression.....</b>	<b>74</b>
5.2.1	Profil der Hauttumorzelllinien.....	74
5.2.2	Stimulation mit den Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ und EGF .....	75
5.2.3	Regulation der Expression von Integrin $\alpha$ 5 und E-Cadherin.....	76
5.2.4	Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors snail-1 .....	79
5.2.5	Zelldissoziation und -migration nach EGF-Stimulation.....	81
5.2.6	Signalwege bei der Regulation der Zellmigration.....	83
5.2.7	Fazit .....	84
<b>5.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Verzeichnis der erfolgten Publikationen.....</b>	<b>VI</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>VII</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>VIII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ANP	atrial natriuretisches Peptid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK1/2	durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase 1/2
GC	Guanylatzyklase
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
ILK	Integrin gekoppelte Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
NF- $\kappa$ B	nukleärer Factor $\kappa$ B
NO	Stickstoff
NPR-A	natriuretischer Peptidrezeptor A
NPR-B	natriuretischer Peptidrezeptor B
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
SCC	Plattenepithelkarzinomzellen (squamous cell carcinoma)
Tab.	Tabelle
TGF $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TS	Transkriptionsstart
VILIP-1	Visinin-like Protein 1

# 1 Zusammenfassung/Abstract

Visinin-like-Protein 1 (VILIP-1), ein Vertreter der neuronalen Kalziumsensorproteine, wirkt in murinen Plattenepithelkarzinomzellen (SCC-Zellen) der Haut als Tumorinvasionssuppressor, indem es die Zell-Matrixadhäsion und die Zellinvasion inhibiert. Bei Ösophagustumoren und nicht-kleinzelligen Lungentumoren ließ sich des Weiteren eine Korrelation zwischen dem Verlust der Expression von VILIP-1 und der Überlebensrate/Prognose zeigen. Die anti-invasive Wirkung ging mit einer reduzierten RhoA- und MMP-9-Aktivität, sowie mit einer verminderten Expression von Fibronektinrezeptoren einher und konnte auf einen erhöhten cAMP-Spiegel in VILIP-1-positiven, weniger aggressiven SCC-Zellen zurückgeführt werden. Im Nervensystem wurde VILIP-1 hingegen vor allem als Modulator der zytosolischen cGMP-Konzentration beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde daher im Zellkulturmodell aus zwei aggressiven Plattenepithelkarzinom-Zelllinien der Haut ohne VILIP-1-Expression und zwei weniger aggressiven, VILIP-1-exprimierenden Zelllinien untersucht, ob der Einfluss von VILIP-1 auf das Metastasierungspotential der Tumorzellen ausschließlich über cAMP-Signalwege oder auch durch die Modulation der cGMP-Signalgebung durch VILIP-1 vermittelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass in aggressiven, VILIP-1-negativen SCC-Zellen ein erhöhter cGMP-Spiegel nach Stimulation der partikulären Guanylatzyklasen NPR-A und NPR-B vorliegt. Die erhöhte cGMP-Konzentration und die resultierende Zunahme der Zellmigration der SCC-Zellen ließen sich auf ein höheres, jedoch von VILIP-1 unabhängiges Expressionsniveau von NPR-A und NPR-B zurückführen. Der durch VILIP-1 bedingte, erhöhte basale cAMP-Spiegel in weniger aggressiven, VILIP-1-positiven SCC-Zellen reduzierte die Zell-Matrixadhäsion sowie die Migration und basierte interessanterweise auf der verstärkten Oberflächenexpression von Adenylatzyklasen, entsprechend des Effekts von VILIP-1 auf die Oberflächenexpression von NPR-B und dem nAChR in Neuronen. Darüber hinaus wurde analysiert, welche extrazellulären Signale und welche intrazellulären Signalmoleküle an der Regulation der Expression von VILIP-1 während der Tumorprogression beteiligt sind. Die chronische Stimulation mit EGF induzierte bei den VILIP-1-exprimierenden Zellen die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und führte neben der Herabsetzung der Expression von E-Cadherin auch zum Verlust der VILIP-1-Expression. Im Unterschied zur Expression von Integrin  $\alpha 5$ , wurde die Expression von E-Cadherin nicht durch VILIP-1 reguliert. Dagegen ließ sich die Expression des Transkriptionsrepressor snail-1, der in VILIP-1 negativen SCC-Zellen exprimiert wurde und dessen Expression in VILIP-1-positiven SCC-Zellen durch EGF-Stimulation induziert werden konnte, sowohl durch VILIP-1 als auch durch Erhöhung des cAMP-Spiegels hemmen. Zusammen mit der Inhibition der Zellmigration durch VILIP-1-cAMP bestätigt dies die



Wirkung von VILIP-1 als Suppressor der Tumorprogression und deutet auf eine protektive Funktion während des EMT-Prozesses hin.

Visinin-like-Protein 1 (VILIP-1), a member of the neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  sensor protein family, acts as a tumor invasion suppressor in murine squamous cell carcinoma (SCC) by inhibiting cell-matrix adhesion and cell migration. Furthermore, in esophageal squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma the loss of VILIP-1 expression was correlated with clinical-pathological features and survival. Anti-invasive effects of VILIP-1 were accompanied by lowered RhoA and MMP 9 activity, as well as by reduced expression of fibronectin receptors and were mediated by increased cAMP levels in VILIP-1 positive SCCs. However, in neurons VILIP-1 was shown to modulate intracellular cGMP levels. Therefore in this thesis a cell culture model of two aggressive SCC cell lines without VILIP-1 expression and two less aggressive, VILIP-1 expressing cell lines was used to analyze, whether the tumor invasion suppressing effect of VILIP-1 was exclusively mediated by cAMP dependent pathways or may also be linked to cGMP dependent signaling. Cyclic nucleotide measurements showed increased levels of cGMP following stimulation of particulate guanylyl cyclases NPR-A and NPR-B in aggressive, VILIP-1 negative SCCs. Elevated cGMP levels were found to be based on a VILIP-1 independent upregulation of NPR-A and NPR-B and led to enhanced cell migration and aggressiveness of SCC cells. In contrast enhanced cAMP signaling reduced cell-matrix adhesion and cell migration. Increased basal cAMP levels were directly correlated with VILIP-1 expression. This effect is most likely based on enhanced surface expression of adenylyl cyclases and would therewith be equivalent to the effect of VILIP-1 on surface expression of NPR-B and nAChR in neurons. In addition it was an aim of this thesis to determine extracellular signals and intracellular signaling molecules involved in the regulation of VILIP-1 expression in tumor progression. Chronic EGF stimulation induced EMT in VILIP-1 positive SCCs and led to the downregulation of E-cadherin expression, as well as of VILIP-1 expression. In contrast to the expression of integrin  $\alpha 5$ , the expression of E-cadherin was not influenced by VILIP-1. On the other hand the expression of the transcriptional repressor snail-1, which was expressed in VILIP-1 negative SCCs and was inducible by EGF stimulation in VILIP-1 positive SCCs, was inhibited by both VILIP-1 expression and elevated cAMP levels. These findings together with the determined inhibition of cell migration by VILIP-1-cAMP points out the role of VILIP-1 as suppressor of tumor progression and suggest a protective function of VILIP-1 in EMT.

## 2 Einführung in die Thematik

### 2.1 Charakteristik maligner Tumorerkrankungen

#### 2.1.1 Tumorgenese

Jährlich erkranken in Deutschland 436.000 Menschen neu an Krebs und 211.500 sterben jedes Jahr daran. Damit sind Krebserkrankungen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen derzeit die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (<http://www.krebshilfe.de/krebszahlen.html>). Den Formenkreis dieser Erkrankungen kennzeichnet das Auftreten von bösartigen Gewebsneubildungen, sogenannter maligner Tumore. Im Unterschied zu gut abgrenzbaren benignen Tumoren wachsen maligne Tumore über Gewebsgrenzen hinaus (infiltrierend), unter Zerstörung von umliegendem Gewebe (destruierend) und unter Bildung von Tochtergeschwülsten (metastasierend). Krebstumore werden nach dem Typ des entarteten Gewebes klassifiziert. Den weitaus größten Teil aller Krebserkrankungen machen Karzinome aus. Diese Tumore epithelialen Ursprungs, werden nochmals differenziert in Plattenepithel- oder squamöse Karzinome (SCC), die sich von verhornter und unverhornter Haut oder Schleimhaut ableiten, und Adenokarzinome, welche sich vom Drüsenepithel ableiten. Sarkome sind mesenchymale Tumore, die vom Stütz- und Bindegewebe ausgehen, und kommen weniger häufiger vor. Zu den selteneren Krebsarten zählen desweiteren neuroendokrine Tumore oder von embryonalem Gewebe ausgehende Teratome. Eine weitere große Gruppe sind die hämatologischen Krebsformen des Blutes und der blutbildenden Organe, die sich in Leukämien und Lymphome unterteilen lassen.

Es sind gegenwärtig etwa 100 verschiedene Krebserkrankungen bekannt, die sich hinsichtlich der Überlebenschancen und der Behandlungsmöglichkeiten zum Teil erheblich unterscheiden. Ein ausschlaggebendes Kriterium dabei ist das Auftreten von Metastasen, welches drastisch die Sterblichkeitsrate erhöht. 90 Prozent aller Krebspatienten, bei denen die Erkrankung zum Tod führt, sterben nicht am Primärtumor, sondern an dessen Metastasen oder damit assoziierten Folgekrankheiten (Sporn, 1997). Die Bildung von Metastasen steht am Ende des mehrstufigen Prozesses der Tumorprogression, in dessen Verlauf genetische Veränderungen die fortschreitende Transformation normaler Zellen in hochmaligne Derivate vorantreiben. Die der Metastasierung vorangehende Umgestaltung der Zellphysiologie ermöglicht zunächst das Wachstum und die Versorgung des Primärtumors. Die entartenden Zellen gewinnen dadurch die für sie typischen Fähigkeiten der Selbstversorgung mit wachstumsfördernden Signalen, der Unempfindlichkeit gegenüber

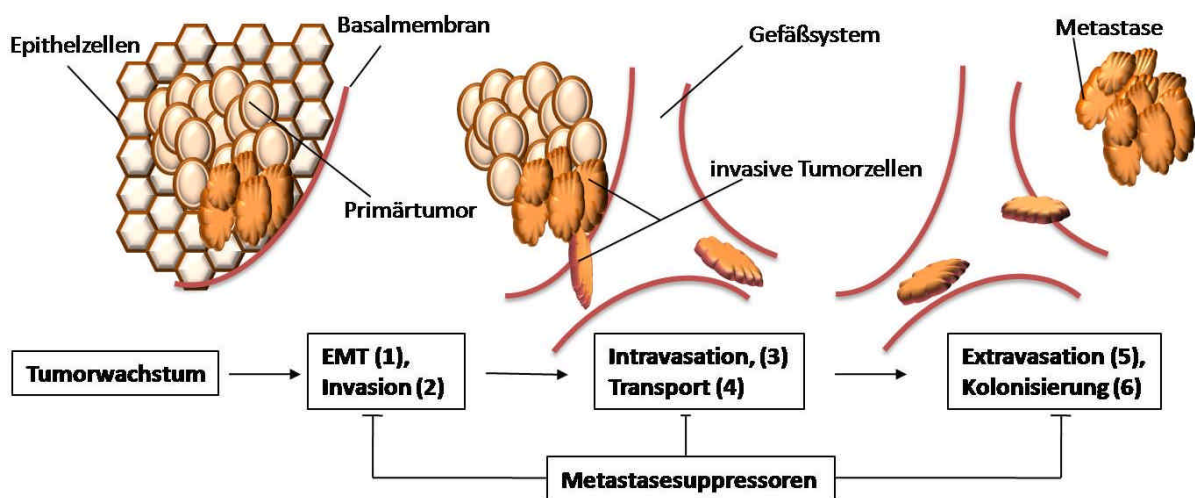
wachstumshemmenden Signalen, der Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose), des uneingeschränkten Zellteilungsvermögens und zur stetigen Anregung von Gefäßneubildungen (Angiogenese) (Hanahan and Weinberg, 2000).

### **2.1.2 Metastasierung und Metastasierungssuppressoren**

In Abhängigkeit von der Art des Tumors setzt früher oder später in der Progression des Primärtumors die Metastasierung ein. Abbildung 2.1.2 gibt einen Überblick über den Hergang des Prozesses. Als ersten Schritt durchlaufen einige Krebszellen eine Umwandlung zu beweglichen, invasiven Zellen (1: Dedifferenzierung). Diese lösen sich vom Primärtumor und wandern durch die Basalmembran hindurch in umliegendes Gewebe ein (2: Infiltration), welches im Zuge dessen zerstört wird. Um die Infiltration zu erleichtern, sezernieren Tumorzellen verstärkt Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die enzymatische Oberflächenrezeptoren und vor allem Komponenten der extrazellulären Matrix degradieren. Erreichen diese aggressiven Zellen Blut- oder Lymphgefäße, dringen sie in die vaskulären Strukturen vor (3: Intravasation) und werden dann über die entsprechenden Systeme verbreitet (4: Transport). Metastasierende Zellen sind außerdem in der Lage an anderer Stelle die Gefäße wieder zu verlassen (5: Extravasation), sich in neuer Umgebung anzusiedeln und zu überleben. Letztendlich bilden sie durch Proliferation neue Kolonien (6: Kolonisierung), aus denen ein Sekundärtumor entstehen kann (Berger et al., 2005). Bei Karzinomen geht die initiale Phase mit morphogenetischen Veränderungen einher, die als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet werden und sich durch einen Wechsel von epithelialen Merkmalen zu Fibroblasten-ähnlichen Merkmalen und einer Dysregulation der Zelladhäsion und Zellmotilität auszeichnen (Lee et al., 2006; Thiery and Sleeman, 2006).

Die biochemischen Vorgänge, die bestimmte Tumorzellen zur Metastasierung befähigen und andere nicht, sind Gegenstand intensiver Forschung. Beispielsweise wird die Rolle sogenannter Krebsstammzellen diskutiert, die als Subpopulation multipotenter Zellen innerhalb des Primärtumors vorkommen und durch Dedifferenzierung, spezielle Stammzellmarker und ein erhöhtes Metastasierungspotential charakterisiert sind (Barnhart and Simon, 2007). Darüber hinaus wird versucht, die molekularen Grundlagen des Metastasierungsprozesses und die beteiligten Regulatoren detailliert zu beschreiben. Analog zur Bestimmung von Onkogenen und Tumorsuppressoren für die Phasen der Entstehung des Primärtumors, welche die Transformation und Proliferation positiv oder negativ beeinflussen, wurden inzwischen auch zahlreiche Faktoren identifiziert, welche die

komplexen Prozesse der Invasion und Metastasierung fördern bzw. hemmen. Metastasierungssuppressorgene kodieren für Proteine, welche die Entstehung von Metastasen *in vivo* reduzieren oder verhindern. Sie unterscheiden sich von Tumorsuppressoren dadurch, dass sie sich nicht auf das Wachstum des Primärtumors auswirken (Smith and Theodorescu, 2009). Kürzlich konnten außerdem microRNA-Moleküle beschrieben werden, welche die Metastasierung unterdrücken, indem sie durch die Bindung an 3' untranslatierte Regionen von Schlüsselgenen deren Expression regulieren (Tavazoie et al., 2008; Ma and Weinberg, 2008).



**Abb. 2.1.2:** Der Metastasierungsprozess. Die Bildung von Metastasen erfordert, dass einige Tumorzellen die beschriebenen Stufen absolvieren. Metastasierungssuppressoren können die Anzahl von Metastasen reduzieren, indem sie die Schritte 1 bis 6 inhibieren, aber nicht das Tumorwachstum.

Anhand ihrer Funktion können Invasions- oder Metastasierungssuppressoren den unterschiedlichen, in Abbildung 2.1.2 dargestellten Phasen im Metastasierungsprozess zugeordnet werden. Es handelt sich dementsprechend um Komponenten und Regulatoren von Zell-Zell- und Zell-Matrixverknüpfungen, Signaltransduktionskaskaden, des zellulären Bewegungsapparates oder der Genexpressionsmaschinerie (Berger et al., 2005; Smith and Theodorescu, 2009).

In Epithelzelltumoren fungiert beispielsweise E-Cadherin, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges transmembranes Zell-Zelladhäsionsprotein, als Suppressor von Invasion und Metastasierung. Seine funktionelle Eliminierung erhöht das invasive Potential von Tumorzellen und ist ein Schlüsselereignis während der EMT (Birchmeier et al.,

1996; Ikeguchi et al., 2000). E-Cadherine auf der Oberfläche von benachbarten Zellen bilden über Homodimere interzelluläre Kontakte und erhalten damit die strukturelle Integrität epithelialer Zellschichten. Zytoplasmatisch weisen Cadherine Bindungsstellen für p120-Catenin und  $\beta$ -Catenin auf, wodurch sie mit dem Wnt-Signalweg gekoppelt sind (vergleiche Abb. 2.1.3.2). Dieser Signalweg kontrolliert Wachstum, Motilität und Differenzierung während der embryonalen Entwicklung, aber auch im Prozess der Krebsentstehung (Lustig and Behrens, 2003). Das Wnt-Signal wird über den Frizzled-Rezeptor auf Dishevelled übertragen, welches die Funktion eines Komplexes aus  $\beta$ -Catenin, Axin, APC (adenomatous polyposis coli) und GSK3 (Glykogensynthase-Kinase 3) blockiert. Statt dem Abbau von  $\beta$ -Catenin, erfolgt dadurch sein Transport in den Zellkern, wo es mit Lymphoid Enhancer-binding Faktor-1/T-Zell-Faktor (LEF-1/TCF) assoziiert und die Transkription von Zielgenen induziert (Lo, 2001). Es gibt zahlreiche Mechanismen, welche die E-Cadherin-Funktion beeinträchtigen können. Dazu gehören Mutationen in den Genen von E-Cadherin oder  $\beta$ -Catenin, Promotorhypermethylierung, transkriptionelle Repression, posttranslationale Modifikationen, erhöhte Internalisierung und die Proteolyse der extrazellulären Domäne (Hirohashi, 1998; Rashid et al., 2001; Guilford, 1999). Die Wiederherstellung der E-Cadherin-Funktion andererseits, beispielsweise durch exogene Expression in Tumorzelllinien oder in einem transgenen Mausmodell für Karzinogenese reduziert die Aggressivität und Invasivität der Krebszellen und beweist so die Metastasierungssuppressorfunktion des Proteins (Christofori and Semb, 1999).

Veränderungen in der Expression von Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen, sind ebenfalls charakteristisch für invasive und metastasierende Tumorzellen. Integrine sind transmembrane Heterodimere aus  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten, die als Rezeptoren für unterschiedliche extrazelluläre Matrixproteine fungieren (Gilcrease, 2007). Über Bindungsstellen in ihren zytoplasmatischen Domänen sind Integrine zum Einen an Aktin-bindende Proteine und zum Anderen an Signalmoleküle wie FAK (focal adhesion kinase) und ILK (integrin linked kinase) gekoppelt und beeinflussen so die Reorganisation des Zytoskeletts und komplexe nachgeschaltete Signaltransduktionsnetzwerke (vergleiche Abb. 2.1.3.2) (Liu et al., 2000; Schaller et al., 1995; Hannigan et al., 2005). Sowohl für die Infiltration in das umliegende Gewebe, als auch für die Kolonisation in neuer Umgebung ist eine Anpassung im Spektrum der exprimierten  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten von Integrinen erforderlich. Dadurch wird die Zell-Matrix-Interaktion mit durch MMPs degradierten Matrixkomponenten anstelle der ursprünglichen gewebsspezifischen Matrix begünstigt (Varner and Cheresch, 1996). Integrine wie  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$  sowie  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$  und  $\alpha6\beta4$  sind Rezeptoren für Collagen und Laminin und werden in den meisten normalen Epithelien exprimiert (Matlin et al., 2003; Watt, 2002). Rezeptoren für Fibronectin ( $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha v\beta6$ ) und

Vitronektin ( $\alpha v\beta 5$ ) kommen nur begrenzt auf der Oberfläche von Epithelzellen vor, werden aber bei Verletzungen und Entzündungsreaktionen hochreguliert (Sheppard, 2003; Albelda et al., 1994; Pilewski et al., 1997). In malignem Epithelgewebe wurde eine reduzierte Expression oder veränderte Lokalisation von  $\alpha 6\beta 4$ - und  $\alpha 3\beta 1$ -Integrinvarianten festgestellt (Natali et al., 1992; Pignatelli and Vessey, 1994), wohingegen erhöhte Vorkommen von  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha v\beta 5$  nachgewiesen werden konnten (Mahloogi et al., 2003). Integrine bestimmen daher als verstärkende oder hemmende Regulatoren maßgeblich das Metastasierungspotential von Krebszellen.

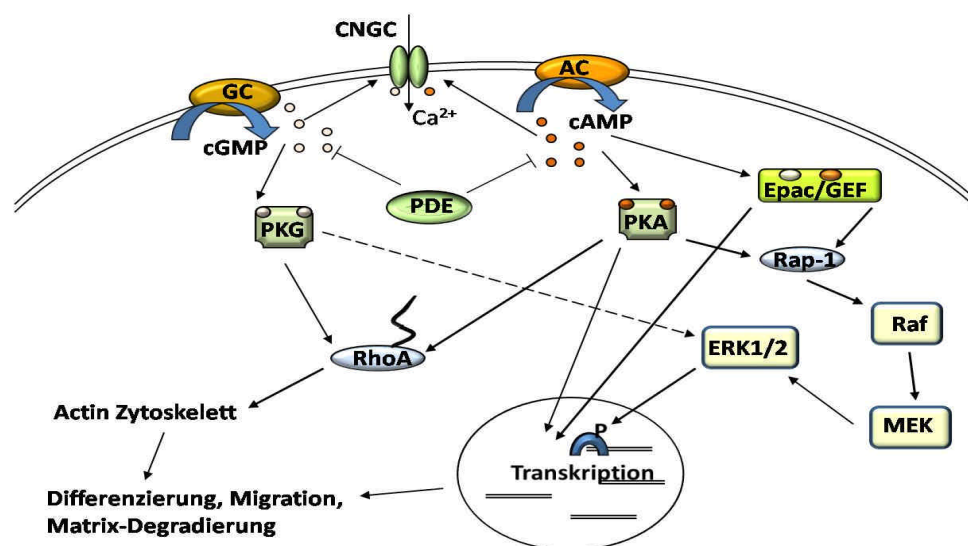
Von immenser Bedeutung für die Regulation der beschriebenen Zell-Zell- und Zell-Matrixadhäsion, aber auch für die Expression weiterer Tumorinvasionsgene oder Metastasierungssuppressoren, welche die Degradierung von extrazellulärer Matrix, das Migrationsvermögen oder den Differenzierungszustand bedingen, ist die Kontrolle der Tumorzellen durch Wachstumsfaktoren. Der Peptidfaktor Metastin/KISS-1, Ligand des G-Proteingekoppelten Rezeptors GPR54, zählt selbst zu den Metastasierungssuppressorgenen. Seine Bindung beeinflusst über die dem Rezeptor nachgeschalteten Signalkaskaden von PLC (Phospholipase C) und MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) die Metastasierung und Koloniebildung (Berger et al., 2005; Ohtaki et al., 2001) (vergleiche Abb. 2.1.3.2). Tumorzellen versuchen die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, die normalen Zellen eigen ist, zu umgehen. Beispielsweise produzieren Glioblastome und Sarkome selbst PDGF (platelet-derived growth factor) und TGF (tumor growth factor) zur autokrinen Stimulation (Jennings et al., 1997). Epitheliale Tumore erhöhen stark die Expression von EGF (epidermal growth factor) oder exprimieren eine strukturell modifizierte, ligandenunabhängig aktive Rezeptorvariante (Jennings et al., 1997). Die Konsequenz der Wachstumsfaktorstimulation ist abhängig vom Zelltyp und der Tumorprogression. So kann TGF $\beta$  (tumor growth factor  $\beta$ ) in frühen Tumorstadien anti-proliferativ in späten aber Metastasen-fördernd wirken (Weeks et al., 2001). EGF und HGF (hepatocyte growth factor) hingegen wurden als Krebswachstums-fördernd, aber anti-invasiv beschrieben (Wells, 2000). Andererseits sind sowohl TGF $\beta$  als auch EGF potente Induktoren der epithelial-mesenchymalen Transition (de et al., 2005b). Über die entsprechenden Wachstumsfaktorrezeptoren werden unterschiedlichste Signalkaskaden aktiviert, was unter anderem in der transkriptionellen Repression von E-Cadherin, der veränderten Expression von Matrixmetalloproteinasen und Integrinen sowie der erhöhten Aktivität von Motilitätsregulatoren wie den Rho GTPasen resultiert.

## 2.1.3 Signalkaskaden mit Einfluss auf die Tumorprogression

### 2.1.3.1 Signalwege der Botenstoffe cAMP und cGMP

Inzwischen wurde vielen Signalkaskaden eine steuernde Rolle bei der Tumorprogression oder Metastasierung zugeschrieben. Krebsrelevant sind beispielsweise die Signalwege der Botenstoffe cAMP (cyclic Adenosinmonophosphate) und cGMP (cyclic Guanosinmonophosphate). Die zelluläre cAMP-Konzentration kann durch die Synthese aus ATP durch Adenylatzyklasen (ACs) erhöht und über Hydrolyse zu AMP durch Phosphodiesterasen (PDE) gesenkt werden. Die meisten Adenylatzyklasen sind membranständig und werden durch heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert (Sunahara and Taussig, 2002). Veränderungen im zytoplasmatischen cAMP-Gehalt werden durch eine Reihe von Effektorproteinen in verschiedenste intrazelluläre Effekte umgesetzt. Wie in Abbildung 2.1.3.1 illustriert gehören zu diesen Effektoren die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), durch cAMP aktivierte Austauschfaktoren (Epacs) und durch zyklische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle (CNGCs) (Dumaz and Marais, 2005). Die Kontrolle der Transkription durch cAMP wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie CREB (cAMP response element binding protein), CREM (cAMP-response element modulator) und ATF-1 realisiert und ist größtenteils abhängig von der Aktivität der PKA (Sands and Palmer, 2008). Über Epac können zusätzlich die Transkriptionsfaktoren AP-1 (Fuld et al., 2005), C/EBP (Sands and Palmer, 2008) und NFAT (Morel et al., 2005) aktiviert werden. Außerdem kann sowohl PKA als auch Epac die Aktivität von Rap-1, einem kleinen G-Protein, beeinflussen. Über diese GTPase kann sich der cAMP-Spiegel zelltypspezifisch auf die Aktivität der MAPK-Kaskade und damit auf die Elk-1-abhängige Transkription auswirken (Busca et al., 2000; MacNicol and MacNicol, 1999) und die Integrin- und E-Cadherin vermittelte Adhäsion beeinflussen (Kooistra et al., 2005). Aufgrund dieser diversen Verschaltungen (vergleiche Abb. 2.1.3.1) kann cAMP einerseits die Proliferation inhibieren, andererseits Differenzierung und Apoptose auslösen (Howe, 2004; Chen et al., 1998; Frisch, 2000). Weiterhin wird durch die cAMP-abhängige Transkriptionskontrolle und durch die Regulation der Aktivität von RhoA über PKA die Tumordinvasion beeinflusst. Mitglieder der Rho-Familie der kleinen GTPasen (RhoA, Rac, Cdc42) bestimmen die Organisation des Zytoskeletts und damit die Motilität von Tumorzellen. Die RhoA-Aktivität wirkt sich über die ROCK (Rho-associated Kinase) und die LIM-K (LIM-Motif containing kinase) auf die Aktin-Polymerisierung aus und parallel über die MLC-Kinase (myosin light chain kinase) auf den Phosphorylierungsstatus von Myosin und bedingt so während der Tumordinvasion die Bildung von Stressfasern und die Zellkontraktilität (Itoh et al., 2007; Raftopoulou and Hall, 2004). Desweiteren inhibiert RhoA die Proliferation und verstärkt die Expression von differenzierungsrelevanten Genen (McMullan et al., 2003).

Der Botenstoff cGMP wird durch membranständige oder lösliche Guanylatzyklen synthetisiert und ebenfalls durch PDEs hydrolysiert. Zu den Effektorproteinen zählen wiederum durch zyklische Nucleotide gesteuerte Ionenkanäle und die cGMP-abhängige Proteinkinase PKG (protein kinase G) (Abb. 2.1.3.1). Diese Kinase kann genau wie PKA die Aktivität von RhoA beeinflussen (Ellerbroek et al., 2003; Pilz and Casteel, 2003). Damit reguliert auch cGMP auf diesem Wege das Migrationsverhalten von Krebszellen sowie ihre Proliferation und Differenzierung. Weiterhin wurde in nicht-kleinzelligen Lungenkrebszellen eine cGMP-abhängige Aktivierung von ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2) und im Zusammenhang damit eine verstärkte Migration dieser Zellen gezeigt. Dagegen führt die Inhibition der PKG in diesen Zellen sowie in Gliazellen zu eingeschränkter Motilität (Punathil and Katiyar, 2009; Boran and Garcia, 2007).



**Abb. 2.1.3.1:** Übersicht über die Signaltransduktionskaskaden der zyklischen Nucleotide und ihr Einfluss auf Metastasierungs-relevante Prozesse. AC: Adenylatzyklase, GC: Guanylatzyklase, CNGC: cyclic nucleotide gated channels, PDE: Phosphodiesterase, PKG: Proteinkinase G, PKA: Proteinkinase A, Epac/GEF: exchange protein directly activated by cAMP, MEK (MAPK/ERK kinase), ERK1/2: extracellular signal regulated kinase 1/2.

### 2.1.3.2 Tyrosinkinaserzeptoren und nachgeschaltete Signalkaskaden

Von besonderem Interesse im Kontext der Tumorprogression sind die in Abbildung 2.1.3.2 veranschaulichten Signalwege, die den Wachstumsfaktorrezeptoren nachgeschalteten sind. Wachstumsfaktoren, wie EGF, PDGF oder HGF binden an Transmembranrezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität, was Autophosphorylierungen in der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren und die Rekrutierung intrazellulärer Signalproteine zur Folge hat. Zu diesen zählt das Adapterprotein GRB2, welches unter anderem den Austauschfaktor

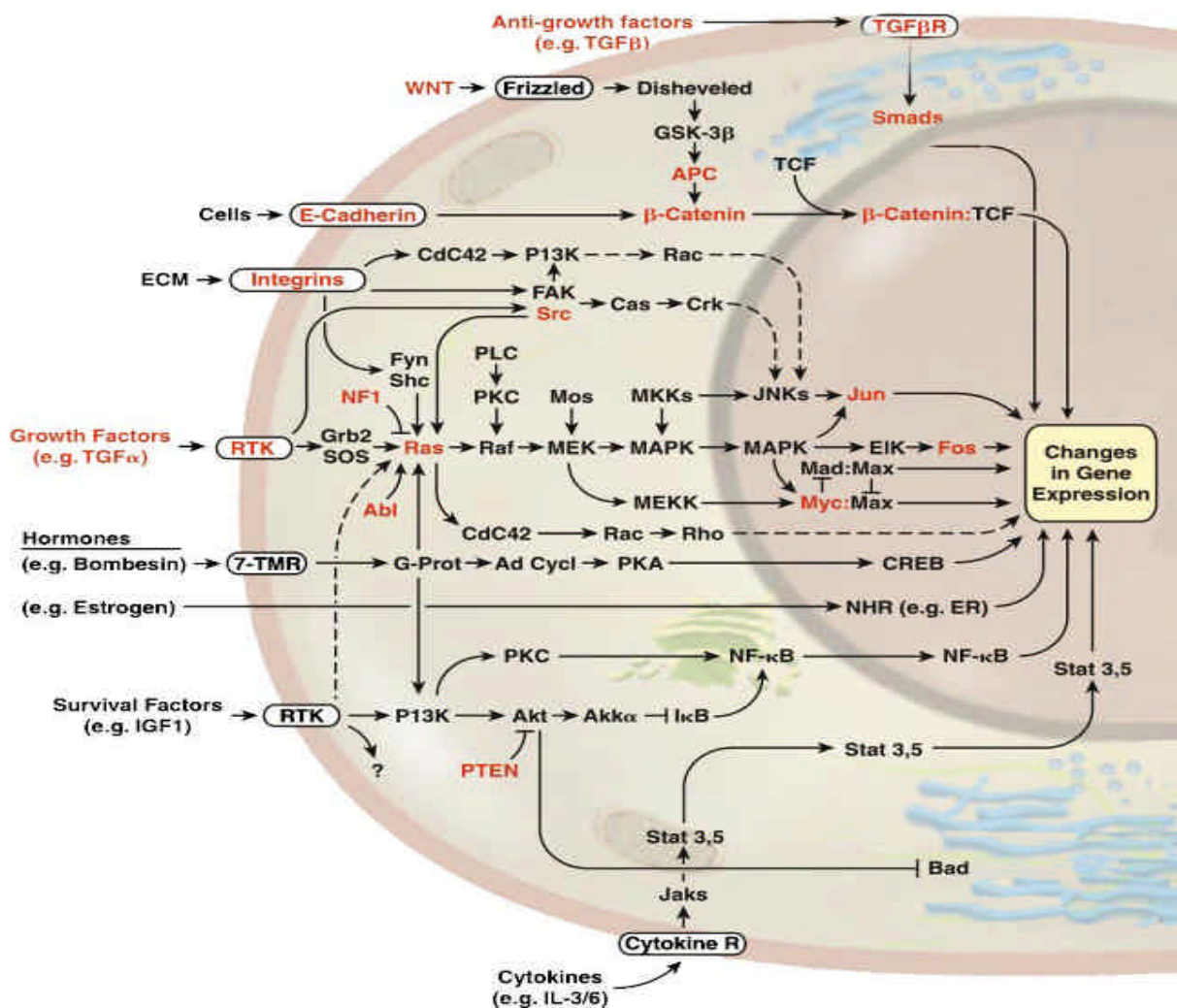


SOS bindet und darüber die GTPase RAS aktiviert. Diese leitet das Signal über den MAPK-Signalweg, eine Kaskade von Kinasen (RAF-Kinase, MAPK-Kinase (MEK), MAP-Kinase (ERK1/2)), weiter, was letztendlich die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie Elk1, c-Myc oder c-Fos bewirkt, die an der Regulation von Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Invasion beteiligt sind (Dumaz and Marais, 2005; Berger et al., 2005). Eine Vielzahl unterschiedlicher Tumorzellen weist eine erhöhte Expression oder Aktivität von ERK1/2 auf (Schmidt et al., 1997; Ito et al., 1998; Specht et al., 2001). Außerdem konnte eine positive Assoziation zwischen der Aktivität von ERK1/2 und dem Migrationspotential unterschiedlicher Zelltypen nachgewiesen werden (Nguyen et al., 1999; Thomson et al., 1994).

Rezeptortyrosinkinasen können auch die Aktivität eines weiteren Signalproteins, der PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase) induzieren und damit einen anderen Signalweg anschalten, der Zellwachstum, Apoptose und Motilität reguliert. Im aktivierten Zustand phosphoryliert PI3K Phosphoinositol-Lipide in der Zellmembran unter Bildung von Phosphoinositol-3-Phosphat (PIP<sub>3</sub>). Dieses Lipid rekrutiert Proteine mit Plekstrin-Homologie-(PH)-Domäne, wie PDK (phosphoinositide-dependent kinase 1) und PKB/Akt (Proteinkinase B) und führt zu deren Aktivierung. Effektorproteine von PKB/Akt vermitteln die durch PI3K regulierten Effekte. Zu diesen Effektoren gehören mTOR (mammalian target of rapamycin), die GTPase Rac, GSK3 (glycogen synthase 3) und Transkriptionsfaktoren (Delcommenne et al., 1998). Die PI3-Kinase, welche zusätzlich durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und die ILK (Integrin-linked kinase) aktiviert werden kann, gilt als Modulator von Zellwachstum, EMT, Invasion und Migration in Tumorzellen und wird bei Ovarialkrebs als putatives Onkogen angesehen (Chen et al., 2009b; Chen et al., 2009a; Yan et al., 2009). Von besonderer Bedeutung für diese Wirkung ist die Phosphorylierung von GSK3 durch PKB/Akt, was den proteolytischen Abbau dieser Kinase hervorruft und damit unter anderem den Transkriptionsrepressor snail-1 stabilisiert. In einer positiven Rückkopplungsschleife verringert die durch snail-1 verursachte Reduktion von E-Cadherin die Funktion von PTEN (Qiao et al., 2008). Dadurch wird weniger PIP<sub>3</sub> abgebaut und folglich weiterhin die PKB und der Metastasierungsprozess aktiviert.

GSK3 spielt nicht nur in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle während der Entwicklung eines Tumors (Kim 2000). Die Aktivität verschiedener Signalkaskaden konvergiert auf der Ebene dieser Kinase. So wirkt sich der cAMP-Signalweg über PKA, der Wnt-Signalweg über Dishevelled (DSH) und die PI3K-Signalkaskade über PKB/Akt auf den Phosphorylierungszustand von GSK3 aus (Woodgett, 2001). Die Besonderheit besteht hier darin, dass diese Kinase nur im Ruhezustand aktiv ist und die Aktivität all dieser Signalwege zur ihrer Inaktivierung führt. Nachgeschaltete Effektoren sind neben der Glykogensynthese

hauptsächlich Transkriptionsfaktoren, beispielsweise  $\beta$ -Catenin (Gotschel et al., 2008), CREB (Grimes and Jope, 2001), c-Jun (Nikolakaki et al., 1993) und NFAT (Beals et al., 1997), welche bei inhibierter GSK3-Aktivität aktiv werden können und dann das Überleben, die Proliferation und Aggressivität von Krebszellen begünstigen. Eine Ausnahme bildet die NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription, die über einen noch unvollständig aufgeklärten Mechanismus durch GSK3 aktiviert werden kann (Kotliarova et al., 2008; Woodgett, 2001). Die Konsequenzen dieser Aktivierung wurden in Pankreas-Adenokarzinomzellen als anti-apoptotisch, Wachstums- sowie Angiogenese-fördernd beschrieben (Billadeau, 2007; Arlt et al., 2003).



**Abb. 21.3.2:** Übersicht über Signalkaskaden mit Einfluss auf das Metastasierungspotential. Gezeigt sind der MAPK- und der PI3K-Signalweg, welche Wachstumsfaktorsignale ausgehend von RTKs (Rezeptortyrosinkinasen) übertragen, das Zusammenspiel von E-Cadherin- und Wnt-Signaltransduktion, die Verschaltung der Integrine, sowie die TGF $\beta$ -Signalgebung. Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie bei der Tumorprogression funktionell verändert werden, sind in rot dargestellt. Erklärung aller relevanten Faktoren im Text (modifiziert nach Hanahan and Weinberg, 2000).

### 2.1.3.3 Signaltransduktion des TGF $\beta$ -Signals

Der Wachstumsfaktor TGF $\beta$  sei abschließend separat erwähnt, da er einen Rezeptortyp mit Serin-Threonin-Kinaseaktivität und keinen Tyrosinkinase-Rezeptor bindet. Dies bewirkt die Aktivierung von SMAD-Faktoren, die das Signal in einer Kaskade in den Zellkern weiterleiten (Abb. 2.1.3.2). Die Transduktion des TGF $\beta$ -Signals löst unter Mitwirkung der p38 MAP-Kinase und des p160/Rho/ROCK-Signalweges Zellzyklusarrest, Differenzierung und Apoptose aus (Kamaraju and Roberts, 2005; Tian and Schiemann, 2009). Auf diesen Effekten beruht die Tumorsuppressorwirkung von TGF $\beta$  in frühen Tumorstadien, die jedoch durch Mutationen oder den Verlust der Expression von Komponenten des TGF $\beta$ -Signalweges während der Tumorprogression unterdrückt werden kann (Han et al., 2004; Hata et al., 1998). In späteren Stadien kann der Wachstumsfaktor dann über die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges die Induktion von EMT bewirken (Xie et al., 2004; Iglesias et al., 2000).

Aufgrund der großen Bedeutung der beschriebenen Signalwege für Tumorgenese und Metastasierung und der essentiellen Funktion von Proteinkinasen in den regulatorischen Netzwerken sind Kinaseinhibitoren vielversprechende Therapeutika in der Krebstherapie. Inhibitoren der Rezeptortyrosinkinasen (Gefitinib, Vandetinib, Sunitinib) werden bereits bei gastrointestinalen Tumoren, Nierentumoren oder Lungentumoren erfolgreich eingesetzt (Adams and Leggas, 2007). Inhibitoren der Abl-Kinase (Imatinib, Dasatinib) sind ein therapeutisches Mittel bei Leukämien. MMP-Inhibitoren wurden ebenfalls in klinischen Studien getestet, zeigten aber im Unterschied zu Kinaseinhibitoren zu wenig Wirksamkeit und starke Nebenwirkungen (Smith and Theodorescu, 2009). Die Wiederherstellung der Funktion oder die exogene Verabreichung von Tumor- und Metastasierungssuppressoren sowie die Inhibition von anderen Proteinkinasen, wie ILK oder PI3K, stellen weitere Möglichkeiten für zukünftige Therapieansätze dar.

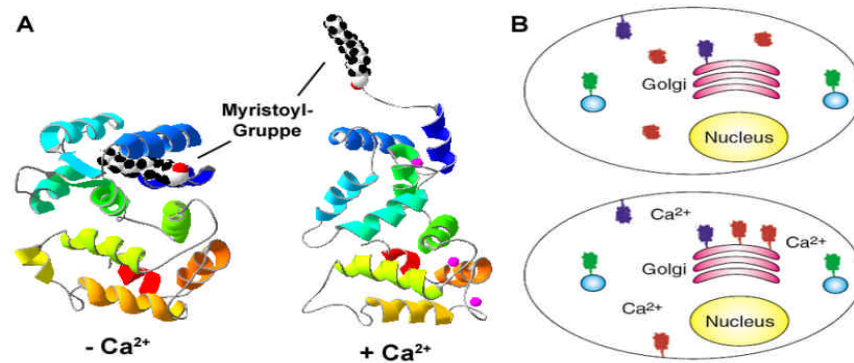
## 2.2 Das neuronale Kalziumsensorprotein VILIP-1

### 2.2.1 Intrazelluläre neuronale Kalziumsensoren (NCS)

Für verschiedene Aspekte der Zellphysiologie spielt Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) als sekundärer Botenstoff eine essentielle Rolle. Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration unterliegt einer strikten Regulation und beeinflusst unter anderem Proliferation, Differenzierung,

Genexpression, Zellkontraktilität und Signaltransduktionskaskaden. Als Reaktion auf Licht, Hormone, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter können Austauschprozesse mit intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien, oder mit dem Extrazellularraum zu einem transienten Anstieg des intrazellulären Kalziumgehalts von 0,1  $\mu\text{M}$  auf bis zu 10 mM führen. Über zelltypspezifische Effektoren, sogenannte Kalziumbindungsproteine kann das Kalziumsignal in eine definierte, lokal begrenzte Antwort umgesetzt werden. Diese Proteine komplexieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in spezifischen Strukturen, anhand derer sie unterschieden werden können. Die Superfamilie der EF-Hand-Proteine umfasst die Mehrzahl der Kalziumbindungsproteine und ihre Mitglieder weisen zwei bis zwölf EF-Hand-Motive auf. Ein solches Motiv besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices (E und F), welche durch eine kalziumbindende Schleife miteinander verbunden sind, und ähnelt in seiner Form Daumen und Zeigefinger einer greifenden Hand (Ikura and Ames, 2006). Während unter den EF-Handproteinen die Kalziumpufferproteine, zu denen Parvalbumin, Calbindin und Calretinin gehören, keine wesentlichen strukturellen Veränderungen durch die Kalziumbindung erfahren, ruft diese in der Untergruppe der Kalziumsensorproteine eine umfassende Konformationsänderung hervor. Dieser Mechanismus erlaubt den Vertretern dieser Gruppe kalziumabhängig Protein-Protein-Interaktionen, Protein-DNA-Interaktionen oder Translokationen an zelluläre Membranen auszuführen. Das ubiquitär vorkommende Calmodulin, das muskelspezifische Troponin C sowie die Familie der intrazellulären neuronalen Kalziumsensorproteine (NCS-Proteine) sind Beispiele für die Untergruppe der Kalziumsensoren.

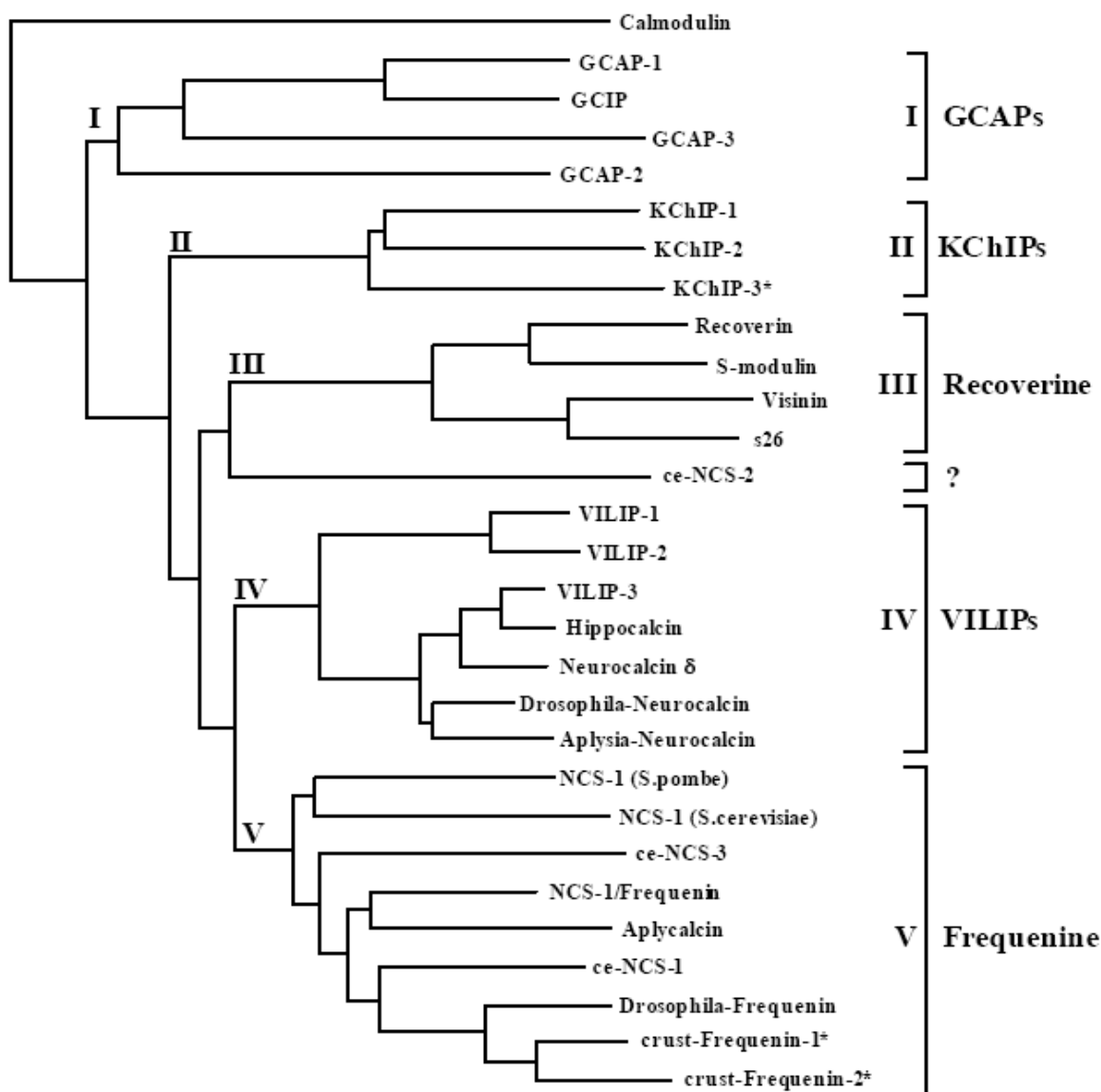
NCS-Proteine werden hauptsächlich im Nervensystem exprimiert (Nef et al., 1995) und ihnen wird eine Rolle bei vielen verschiedenen neuronalen Funktionen, wie der Modulation der Neurotransmitterausschüttung, der Signaltransduktion oder des Membranrezeptorrezyclings zugeschrieben (Braunewell and Gundelfinger, 1999; Brackmann et al., 2005; Burgoyne and Weiss, 2001). Die Mitglieder dieser Familie besitzen typischerweise vier EF-Hand-Motive, von denen aber nur zwei oder drei funktionell sind (Burgoyne et al., 2004). EF-Hand 1 hat generell keine Kalziumbindungsfunktion, sondern wirkt vermutlich bei Interaktionsprozessen oder dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Myristoyl-Switch dieser Proteine mit. Abbildung 2.2.1.1 zeigt schematisch die Struktur und die subzelluläre Verteilung von NCS-Proteinen. Die N-terminale kovalente Modifikation mit Fettsäuren (Acylierung) ist ebenfalls charakteristisch für neuronale Kalziumsensoren und erlaubt die reversible Assoziation mit zellulären Membranen. Diese ist entweder konstitutiv möglich, oder erst nach Exposition des Fettsäurerests infolge der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung, wie beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Myristoyl-Switch (Braunewell and Gundelfinger, 1999; Burgoyne et al., 2004) (vergl. Abb. 2.2.1.1).



**Abb. 22.1.1:** Kalzium-Myristoylswitch und subzelluläre Lokalisation: A:  $\text{Ca}^{2+}$ -freie (links) und  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundene Form von Recoverin (modifiziert nach Ames et al. 1997). B: Intrazelluläre Verteilung der NCS-Proteine mit konstitutiver und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Membranassoziation vor (oben) und nach (unten) Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (modifiziert nach Burgoyne et al. 2004).

Trotz hoher Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen der Kalziumsensoren, zeigen sie Gewebe- und Zelltyp-spezifische Expressionsmuster und haben unterschiedliche Funktionen. Die Familie umfasst 14 Mitglieder bei den Säugetieren und mehr als 40 Vertreter aus allen Spezies (Braunewell and Gundelfinger, 1999; Burgoyne et al., 2004). Diese können basierend auf ihren sequenziellen Homologien in fünf Untergruppen und den einzeln stehenden *C. elegans* Vertreter *ce-NCS2* eingeteilt werden (Nef et al., 1995; Polans et al., 1996; Spilker et al., 2002a). Eine Übersicht über die Verwandtschaftsbeziehungen der NCS-Proteine gibt der in Abbildung 2.2.1.2 dargestellte Stammbaum, der mit dem EF-Hand Protein Calmodulin als Referenz erstellt wurde.

Zur Gruppe der Recoverine gehören Recoverin und Visinin sowie ihre Frosch-Orthologen. Recoverine werden speziesübergreifend in Photorezeptoren und den inneren Schichten der Retina exprimiert (Kawamura et al., 1996) und sind dort an der Regulation der Lichtadaptation und den Regenerierungsprozessen beteiligt. GCAPs (Guanylatzyklase-aktivierenden Proteine) weisen ebenfalls eine vorrangig retinale Expression und eine Funktion bei Regenerierungsprozessen in den Photorezeptoren auf (Dizhoor and Hurley, 1999). Die KChIPs (Kaliumkanal-interagierenden Proteine) bilden eine weitere Untergruppe. Sie sind mit den Kaliumkanaluntereinheiten Kv4.2 und Kv4.3 kolokalisiert (Morohashi et al., 2002) und bestimmen ihre intrazelluläre Verteilung. KChIP3/DREAM (downstream regulatory element antagonist modulator) wirkt darüberhinaus als Repressor der Transkription und bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an DRE-Sequenzen (Jacobson et al., 2006). Unter der Bezeichnung Calsenilin wurde das KChIP3-Protein wegen seiner Wechselwirkungen mit Presenilin charakterisiert. Presenilin spielt eine Rolle bei der Bildung von  $\beta$ -Amyloid und bei der Induktion von Apoptose in Neuronen. Aufgrund dessen ist Calsenilin im Kontext der Alzheimer Erkrankung von Bedeutung (Buxbaum, 2004).



**Abb. 2.2.1.2:** Dendrogramm der Familie der intrazellulären Neuronalen Kalziumsensorsproteine. Modifiziert nach Braunewell und Gundelfinger, 1999. Es sind die phylogenetischen Beziehungen der einzelnen NCS-Proteine zueinander basierend auf ihren Aminosäuresequenzen aus der Swiss-Prot-Datenbank dargestellt. (\* KChIP3 alias DREAM, Calsenilin; crust-Frequenin-1 (*Ocronectes limosus*), crust-Frequenin-2 (*Palinurus pencillatus*)), GCAP-4-8 bisher nicht berücksichtigt

Die Frequentine stellen die evolutionsgeschichtlich älteste Gruppe und auch ihre Mitglieder werden wie die anderen NCS-Proteine vor allem im Nervensystem exprimiert und erfüllen zahlreiche Funktionen. Bei Säugetieren interagiert NCS-1 mit der PI3-Kinase und moduliert somit die Signaltransduktion (Kapp-Barnea et al., 2003). Neben der Regulation der Exozytose (Kapp-Barnea et al., 2003), sowie der Endozytose von Kaliumkanälen und spannungsabhängigen Kalziumkanälen (Guo et al., 2002) konnte ein Einfluss von NCS-1 auf Lern- und Gedächtnisprozesse nachgewiesen werden (Sippy et al., 2003).

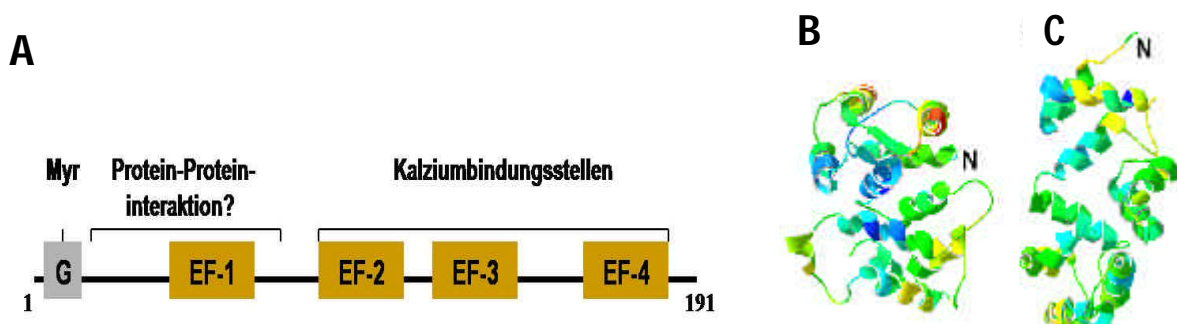
Der Gruppe der Visinin-like proteins (VILIPs) gehört neben VILIP-2, VILIP-3, Hippocalcin und den Neurocalcinen auch VILIP-1 an, welches in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden soll. Die VILIPs sind 191 bis 193 Aminosäuren lang und weisen alle die Konsensussequenz für eine N-terminale Myristoylierung auf (Braunewell and Gundelfinger, 1999). Die Homologie innerhalb dieser Untergruppe ist mit 67 Prozent bis 94 Prozent Sequenzübereinstimmung sehr hoch. Dennoch unterscheiden sich die Proteine in ihrer Affinität für Kalzium, in der Kinetik mit der sie an zelluläre Membranen binden und darin mit welchen subzellulären Kompartimenten sie assoziieren sowie in ihren Interaktionspartnern (Braunewell and Klein-Szanto, 2009). Die Expression der Vertreter dieser Gruppe erstreckt sich von verschiedenen Hirnregionen (Paterlini et al., 2000) (Saitoh et al., 1995), über die Retina (Bastianelli et al., 1995; De et al., 1995) bis hin zu peripheren Geweben (Gierke et al., 2004; Spilker et al., 2000). Vielfältige Funktionen wurden für VILIP-Proteine beschrieben. VILIP-1, Hippocalcin und Neurocalcin  $\delta$  sind in die Regulation der Signaltransduktionswege der zyklischen Nukleotide involviert. Während VILIP-1 die olfaktorische Adenylatzyklase hemmt (Boekhoff et al., 1997) und die Funktion der Guanylatzyklase B (NPR-B) verstärkt (Brackmann et al., 2005), aktiviert Neurocalcin  $\delta$  die olfaktorische Adenylatzyklase und inhibiert die olfaktorische Guanylatzyklase (Mammen et al., 2004). Neurocalcin  $\delta$  agiert als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Regulator der retinalen Guanylatzyklase 1 (retGC1) (Krishnan et al., 2004) und der olfaktorischen Guanylatzyklase (GC-D) (Duda et al., 2004). Hippocalcin wurde außerdem in einem Hefe-2-Hybridverfahren als möglicher Interaktionspartner der MLK2/3 (mixed-lineage Kinase 2/3) identifiziert und könnte auf diesem Wege Signalmoleküle wie Rac und Cdc42 sowie verschiedene MAP-Kinasen beeinflussen (Nagata et al., 1998). Hippocalcin und VILIP-3 wurden als Modulatoren der MAP-Kinase ERK beschrieben (Kobayashi et al., 2005; Spilker et al., 2002b). VILIP-2 reduziert die Inaktivierung von  $\text{CaV}2.1$ -Kanälen, was sich auf die präsynaptische Neurotransmitterausschüttung auswirkt (Lautermilch et al., 2005). Desweiteren beeinflussen VILIPs die Genexpression, den intrazellulären Transport von Rezeptoren und Ionenkanälen und die Umgestaltung des Zytoskeletts. Durch ihre zahlreichen Funktionen sind sie in physiologische Prozesse, wie die Insulinausschüttung, Sinneswahrnehmungen und Lern- und Gedächtnisleistungen involviert, aber auch in Pathophysiologien, wie die Alzheimer Erkrankung, die Schizophrenie oder maligne Tumorerkrankungen (Braunewell, 2005). Auf den Vertreter VILIP-1 soll im Folgenden näher eingegangen werden.

## 2.2.2 Visinin-like protein 1 (VILIP-1)

### 2.2.2.1 Allgemeine Charakterisierung von VILIP-1

VILIP-1 wurde ursprünglich sowohl aus der Ratte als neuronales Visinin-ähnliches Protein 1 (NVP-1) (Kuno et al., 1992), als auch aus dem Huhn als Visinin-ähnliches Protein (VILIP) kloniert (Lenz et al., 1992) und war damit das Gründungsmitglied der Untergruppe der VILIPs. Das humane VILIP-1-Gen (VSNL1) ist auf Chromosom 2 lokalisiert, 117,983 kb lang und besteht aus vier Exons, von denen das erste außerhalb der kodierenden Region liegt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&l=VSNL1>). Kürzlich konnte ein potentieller Promotor innerhalb von 2 kb aufwärts vom Transkriptionsstart kloniert werden (Fu et al., 2008). Die Methylierung zweier CpG-Inseln in diesem Sequenzbereich stellt einen epigenetischen Mechanismus zur Reduktion der VILIP-1-Expression dar (Fu et al., 2008). Die Identifizierung regulatorischer Elemente in der Promotorregion, um die Modulation der VILIP-1-Genexpression detaillierter zu beschreiben, ist derzeit Gegenstand von weiteren Untersuchungen.

Aufbau und Struktur des translatierten Proteins sind in Abbildung 2.2.2.1 dargestellt. VILIP-1 ist 191 Aminosäuren lang (22 kDa) und besitzt mit 4 EF-Hand-Motiven und der N-terminalen Myristoylierungs-Konsensussequenz die typischen Merkmale der NCS-Proteine. EF-Hand-1 wirkt nicht bei der Kalziumbindung mit. Obwohl bisher noch keine weiteren funktionellen Domänen identifiziert werden konnten, repräsentiert EF-Hand-1 die putative Region für Wechselwirkungen mit Interaktionspartnern (Braunewell and Klein Szanto, 2009). In hippocampalen Neuronen liegt das Protein zytoplasmatisch, assoziiert mit der Zellmembran und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig gebunden an die trans-Golgi-Membran vor (Spilker and Braunewell, 2003).



**Abb. 2.2.2.1.:** A: Domänen in der Aminosäuresequenz von VILIP-1 und vorhergesagte Proteinstruktur (Diplomarbeit, Kristian Lange) ohne (B) und mit (C)  $\text{Ca}^{2+}$ .



VILIP-1 zeigt eine weit verbreitete Expression mit Schwerpunkt im Nervensystem (Braunewell and Gundelfinger, 1999). In einer Expressionsstudie konnte VILIP-1-mRNA in den meisten Hirnregionen der Ratte nachgewiesen werden (Paterlini et al., 2000). Auf Proteinebene konnte dies im menschlichen Gehirn (Saitoh et al., 1995) sowie im Cerebellum und im Hippocampus der Ratte (Spilker et al., 2000) bestätigt werden. Innerhalb des Hippocampus variiert das Expressionsmuster speziesabhängig (Zhao and Braunewell, 2008; Bernstein et al., 1999; Lenz et al., 1996). Bei der Ratte zeigen alle hippocampalen Regionen VILIP-1-Immunreaktivität, auf zellulärer Ebene vor allem Interneurone, aber auch Prinzipalneurone (Zhao and Braunewell, 2008). Im Cerebellum kommt VILIP-1 vorrangig in der Körnerzellschicht vor, wird aber nicht in Purkinjezellen exprimiert (Lenz et al., 1996, Spilker et al., 2000). Darüberhinaus wird VILIP-1 im sensorischen System, speziell in Zellen der Retina (De et al., 1995; Lenz et al., 1992; Krishnan et al., 2004) und in olfaktorischen Rezeptorneuronen (Boekhoff et al., 1997; Braunewell and Gundelfinger, 1999), sowie in peripheren Geweben exprimiert. Eine Expressionsstudie von Gierke et al. wies VILIP-1 in Herz, Leber, Lunge und Testisgewebe der Ratte und des Menschen nach (Gierke et al., 2004). VILIP-1-mRNA wurde ebenfalls in Lunge und Herz sowie zusätzlich im Darmgewebe detektiert (Kajimoto et al., 1993; Ohya and Horowitz, 2002). Hinzu kommt der Nachweis der VILIP-1-Expression in  $\beta$ -Zellen des Pankreas und in basalen epidermalen Keratinozyten (Dai et al., 2006; Mahloogi et al., 2003).

Dieses Expressionsmuster impliziert sowohl die Möglichkeit zelltypspezifischer Funktionen als auch der Beteiligung an der allgemeinen Homöostase von Zellen. Inzwischen konnten einige funktionelle Zusammenhänge und Wechselwirkungen mit speziellen Interaktionspartnern beschrieben werden. In einem Modell für Proteinsynthese-abhängige Plastizität in Neuronen konnte in Folge einer chemisch induzierten Langzeitpotenzierung eine erhöhte Expression von VILIP-1 nachgewiesen, was auf eine Funktion des Kalziumsensorproteins bei der synaptischen Plastizität hindeutet (Brackmann et al., 2004; Braunewell et al., 2003). Außerdem bewirkt der Antagonist des ionotropen NMDA-Glutamatrezeptors Ketamin einerseits eine Reduktion in der Expression von VILIP-1 in hippocampalen Pyramidenzellen und andererseits eine erhöhte Expression des Proteins in Interneuronen des Hippocampus (Bernstein et al., 2003). Ein ähnliches Expressionsmuster ist im Kontext der Schizophrenie vorzufinden. Im Gehirn von Schizophrenie-Patienten wurde post mortem im Vergleich zu Kontrollproben gesunder Personen eine reduzierte VILIP-1-Immunreaktivität in Pyramidenzellen und eine erhöhte in Interneuronen detektiert (Bernstein et al., 2002). Microarraystudien und Untersuchungen in einem Tiermodell für Schizophrenie bestätigten diese Ergebnisse (Miklos and Maleszka, 2004; Vercauteren et al., 2007). Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) spielen sowohl bei synaptischer Plastizität als

auch bei Schizophrenie eine Rolle (Hogg et al., 2003) und es konnte eine Interaktion von VILIP-1 mit der  $\alpha$ -Untereinheit des  $\alpha 4\beta 2$  nAChR (Lin et al., 2002a) sowie ein Einfluss auf die Aktivität und die Oberflächenexpression dieses Rezeptors gezeigt werden (Lin et al., 2002b; Zhao et al., 2009). Daher könnte sich der Effekt des veränderten Expressionsspiegels von VILIP-1 über die Interaktion mit dem nAChR auf die Pathologie der Schizophrenie, wie auch auf Aspekte synaptischer Plastizität auswirken (Braunewell, 2005; Gierke et al., 2008). Für eine weitere Neuropathologie, die Alzheimer Erkrankung, spielt VILIP-1 ebenfalls eine Rolle (Bernstein and Braunewell, 2009). In diesem Zusammenhang war eine stark verringerte Anzahl VILIP-1-positiver Neurone im temporalen Cortex von Alzheimer-Patienten nachweisbar (Braunewell et al., 2001a). Ferner kann die Assoziation des NCS-Proteins mit Amyloidplaques sowie die durch VILIP-1 verstärkte Tau-Phosphorylierung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Zytotoxizität zur Progression dieser Erkrankung beitragen (Schnurra et al., 2001).

Die Modulation der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleotide ist eine weitere beschriebene Funktion von VILIP-1. In stabil mit VILIP-1 transfizierten C6-Glioma-Zellen, PC12 Phäochromozytomzellen und Neuro2A Neuroblastomzellen wurde eine Akkumulation von cGMP beobachtet. Wie der Einsatz einer Myristoylierungsmutante dieses Kalziumsensorproteins zeigte, ist diese Wirkung abhängig von seiner Membranlokalisation (Braunewell et al., 2001b). Der cGMP-Spiegel erhöhende Effekt wurde auch in hippocampalen Neuronen und in Kleinhirnzellen festgestellt und wird über die partikulären Guanylatzyklasen A (NPR-A) und B (NPR-B) vermittelt. NPR-B wurde als weiterer Interaktionspartner identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass VILIP-1 die Oberflächenexpression des Enzyms erhöht (Brackmann et al., 2005). Eine Akkumulation von cAMP bedingt durch die Expression von VILIP-1 konnte ebenfalls in C6-Gliomzellen (Braunewell et al., 1997) und desweiteren in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK) (Lin et al., 2002b) und MIN6  $\beta$ -Zellen des Pankreas beobachtet werden. VILIP-1 beeinflusst in diesen pankreatischen Zellen cAMP-vermittelt die Insulinausschüttung (Dai et al., 2006). In olfaktorischen Membranfraktionen hingegen inhibierte rekombinantes VILIP-1-Protein die Aktivität der olfaktorischen Adenylatzyklase und in den stabil transfizierten PC12- und Neuro2A-Zellen konnte kein Effekt von VILIP-1 auf den cAMP-Spiegel nachgewiesen werden.

### 2.2.2.2 VILIP-1 als Tumorinvasionssuppressor

In neueren Studien zu differenziell exprimierten Genen in murinen Hauttumorzellen unterschiedlicher Aggressivität konnte VILIP-1 als potentieller Tumorinvasionssuppressor identifiziert werden. Die VILIP-1-Expression basaler epidermaler Keratinozyten war in daraus hervorgegangenen Plattenepithelkarzinomzellen (SCC) abgeschwächt und in aggressiven SCC-Zellen sogar gänzlich verloren gegangen (Mahloogi et al., 2003). Interessanterweise konnte in einem Zellkulturmodell dieser Plattenepithelkarzinomzellen gezeigt werden, dass die VILIP-1-Expression mit einem reduzierten Adhäsions- und Invasionspotential einhergeht und dass diesem Effekt wiederum ein erhöhter cAMP-Spiegel zu Grunde liegt. Die VILIP-1-positiven, weniger aggressiven SCC-Zellen wiesen außerdem eine verringerte MMP9- und RhoA-Aktivität auf (Mahloogi et al., 2003). Zudem wurde in diesen Zellen im Vergleich zu den VILIP-1-negativen Zellen auch ein herabgesetztes Expressionsniveau von  $\alpha v$  und  $\alpha 5$  Integrin-Untereinheiten bestimmt (Gonzalez Guerrico et al., 2005), wodurch die vermutete Wirkung von VILIP-1 als Tumorinvasionssuppressor in Hauttumorzellen bestätigt werden konnte. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass die Expression von VILIP-1 in einer Vielzahl maligner Gewebe, darunter squamöse Karzinome des Ösophagus (Wickborn et al., 2006), nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (Fu et al., 2008) und Neuroblastome (Xie et al., 2007), unterschiedlich reguliert wird. In humanen Ösophagustumoren war die Expression des Kalziumsensorproteins im Vergleich zum normalen Plattenepithel ebenfalls stark reduziert. Das Expressionsniveau von VILIP-1 korrelierte mit dem Grad der Infiltrierung der Tumore in das umliegende Gewebe sowie mit dem Befall von Lymphknoten und kommt daher als diagnostischer Marker für Ösophagustumore in Frage (Wickborn et al., 2006). Genetische Analysen bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen ergaben zum einen, dass der Verlust der VILIP-1-Expression nicht durch Mutationen oder Umformungen der Gensequenz, jedoch durch Promotormethylierung hervorgerufen werden kann und zum anderen, dass auch bei diesem Tumortyp die Überlebenschancen/Prognose mit der VILIP-1-Expression korreliert ist (Fu et al., 2008). Im Gegensatz dazu wurde VILIP-1 in einer Affymetrix-Studie zum Vergleich des Transkriptoms von hochinvasiven und weniger invasiven Neuroblastomzellen unter den Genen identifiziert, die in den Zellen mit invasiverem Phänotyp verstärkt exprimiert werden. Außerdem wurde VILIP-1 bei Patienten mit Metastasen verglichen mit Patienten ohne Metastasen überexprimiert (Xie et al., 2007). Die Ergebnisse all dieser Studien unterstützen die Hypothese, dass VILIP-1 auch im Kontext von Tumorpathologien eine Rolle spielt, deuten aber auch auf eine gewebespezifische Wirkung des VILIP-1-Expressionsniveaus für die Tumorprogression hin, die noch detaillierter aufgeklärt werden muss.

## 2.3 Fragestellung

Die Metastasierung maligner Tumore ist ein komplexer, bisher nur unzureichend aufgeklärter Prozess mit individuellen und gewebespezifischen Besonderheiten. Ein besseres Verständnis der zu Grunde liegenden Veränderungen der Zellphysiologie könnte molekulare Ziele für die Entwicklung neuer anti-invasiver Strategien für Krebstherapien identifizieren. Inhalt dieser Arbeit ist es daher, die biologischen Mechanismen, auf denen die Wirkung des neuronalen Kalziumsensorproteins VILIP-1 als Tumorinvasionssuppressor in Hauttumorzellen beruht, eingehend zu untersuchen.

Ein Ziel dabei ist die Analyse der Signalwege, über deren Aktivität die anti-invasive Wirkung von VILIP-1 realisiert wird. Eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration in Folge der Expression von VILIP-1, sowie ein Einfluss dieser Erhöhung auf Adhäsion und Invasion wurden bereits gezeigt. Dieser Effekt soll besonders im Hinblick auf mögliche Wechselwirkungen mit spezifischen Adenylatzyklase-Isoformen näher charakterisiert werden. Da VILIP-1 in Gliazellen, hippocampalen Neuronen und neuralen Tumorzelllinien auch den cGMP-Spiegel moduliert und sich cGMP-Signalwege außerdem auf die Metastasierung auswirken, ist ein weiteres Ziel festzustellen, ob im Hauttumorzell-Modell zusätzlich eine veränderte cGMP-Signalgebung vorliegt.

Darüberhinaus stellt sich die Aufgabe, Faktoren und Signalkaskaden, die zur veränderten Expression des NCS-Proteins in Plattenepithelkarzinomzellen unterschiedlicher Aggressivität führen, zu bestimmen. Um den Verlust der VILIP-1-Expression im Prozess der Metastasierung einzuordnen, soll der Einfluss der Stimulation mit krebsrelevanten Wachstumsfaktoren auf das Expressionsniveau von VILIP-1 ermittelt werden. Ebenfalls von Interesse ist es, Effektoren in den nachgeschalteten Signalkaskaden von Wachstumsfaktoren, die tatsächlich die Expression von VILIP-1 modulieren, in diesem Zusammenhang zu erforschen.

Die Effekte einer Modulation der VILIP-1-Expression und der unter den beiden genannten Gesichtspunkten als relevant ermittelten Signalwege sollen jeweils in funktionellen Untersuchungen zur Wirkung des Proteins auf Teilaspekte der Metastasierung, wie Differenzierung, Adhäsion und Migration analysiert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

In den folgenden Übersichten sind alle verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien vermerkt. Spezielle Lösungen und eingesetzte Kits sind in der entsprechenden Methodenbeschreibung aufgelistet. Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) hergestellt.

#### 3.1.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmittel

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfid (APS)	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O)	Serva, Heidelberg
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Calbiochem, Darmstadt
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Pferdeserum	Gibco BRL, Eggenstein

**Chemikalien**

Phenolrot  
 Polyacrylamid  
 Salzsäure (HCl)  
 SDS  
 TEMED  
 Tris  
 Tris-Acetat  
 Tris-Base  
 Triton X-100 (TX-100)

**Hersteller**

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Serva, Heidelberg

**Verbrauchsmaterialien**

Objektträger  
 Parafilm  
 Petrischalen  
 PVDF-Membran

**Hersteller**

Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Greiner Bio-One, Frickenhausen  
 Roth, Karlsruhe

**3.1.2 Allgemeine Materialien für die Zellkultur****Produkt**

10 ml Pipetten  
 15 ml- Zentrifugenröhrchen  
 50 ml- Zentrifugenröhrchen  
 Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)  
 (4500 mg/l Glukose, 584 mg/l L-Glutamin,  
 110 mg/l Pyruvat)  
 Fibronektin  
 Filtereinheiten 0,2 µm steril  
 Fötale Kälberserum (FKS)  
 Kulturschalen mit 6, 12, 24 oder 96 Vertiefungen  
 L-Glutamin  
 Lipofectamin 2000  
 OptiMEM  
 PBS  
 Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B  
 Poly-D-Lysin

**Hersteller**

Greiner Bio-One, Frickenhausen  
 Biochrom, Berlin  
 Biochrom, Berlin  
 Gibco BRL, Eggenstein  
 Calbiochem, Darmstadt  
 Schleicher & Schuell, Dassel  
 Gibco BRL, Eggenstein  
 Biochrom, Berlin  
 Gibco BRL, Eggenstein  
 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA  
 Gibco BRL, Eggenstein  
 Biochrom, Berlin  
 Gibco BRL, Eggenstein  
 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Trypan Blue Stain 0,4%	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Biochrom, Berlin

### 3.1.3 Effektoren und Inhibitoren

Produkt	Hersteller
8Br-cAMP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
8Br-cGMP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ANP (Atrial Natriuretic Peptide)	Calbiochem, San Diego, CA, USA
CNP (C-type Natriuretic Peptide)	Calbiochem, San Diego, CA, USA
EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ERK1/2-Inhibitor (ERK activation inhibitor peptide I)	Calbiochem, San Diego, CA, USA
FSK (Forskolin)	Calbiochem, San Diego, CA, USA
GSK-3-Inhibitor IX	Calbiochem, San Diego, CA, USA
H-89, PKA-Inhibitor	Calbiochem, San Diego, CA, USA
JNK-Inhibitor	Calbiochem, San Diego, CA, USA
KT5823, PKG-Inhibitor	Calbiochem, San Diego, CA, USA
LY 294002, PI3K-Inhibitor	Calbiochem, San Diego, CA, USA
PD 98059, MEK-Inhibitor	Calbiochem, San Diego, CA, USA
SB 202190, p38 MAPK-Inhibitor	Calbiochem, San Diego, CA, USA
SNOG (S-Nitrosoglutathion)	Calbiochem, San Diego, CA, USA
TGFβ1 (Transformierender Wachstumsfaktor)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

### 3.1.4 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Polyklonale Antikörper gegen ein rekombinantes VILIP-1-Fusionsprotein wurden im Kaninchen erzeugt. Diese wurden, wie bei Braunewell et al. 2001 beschrieben, über Agarosesäulen, welche immobilisiertes, Gluthathion-S-Transferase (GST)-gekoppeltes Fusionsprotein gebunden hatten, Affinitäts-gereinigt (Bio-Rad, Hercules, CA). Das resultierende Eluat wurde außerdem über Agarosesäulen mit VILIP-2- und VILIP-3-Fusionsproteinen aufgereinigt, um Kreuzreaktivität zu vermeiden.

Zur Isoform-unabhängigen Detektion von Adenylatzyklasen wurden polyklonale Antikörper aus Kaninchen, gerichtet gegen ein C-terminales 14-Aminosäuren-Peptid (IGARKPQYDIWGNT), das in allen Adenylatzyklaseisoformen konserviert ist (ACcomm), herangezogen (Braunewell and Gundelfinger, 1997; Jacobowitz and Iyengar, 1994; Mons and Cooper, 1994).

Die Detektion von E-Cadherin erfolgte mittels polyklonaler E-Cadherin Antikörper (gp 184) gerichtet gegen ein extrazelluläres Epitop (Kasper et al., 1995), die freundlicherweise von Professor Ottmar Huber (Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité Universitätsmedizin) bereitgestellt wurden (Huber et al., 1999).

**Tabelle 3.1.4.1:** Übersicht über die verwendeten primären Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Maus anti $\beta$ -Aktin monoklonal	<b>1:8000</b>	Sigma (St. Louis, MO)
Kaninchen anti VILIP-1 polyklonal	<b>1:4000</b>	AG Braunewell, Charité Universitätsmedizin Berlin
Kaninchen anti ACcomm polyklonal	<b>1:100</b>	AG Braunewell, Charité Universitätsmedizin Berlin
Kaninchen anti Integrin $\alpha$ 5 polyklonal	<b>1:5000</b>	Chemicon, Temecula, CA, USA
Kaninchen anti E-Cadherin polyklonal	<b>1:4000</b>	AG Huber, Charité Universitätsmedizin Berlin

### Sekundäre Antikörper

**Tabelle 3.1.4.2:** Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti Maus IgG [HRP-konjugiert]	<b>1:25000</b>	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Ziege anti Kaninchen IgG [HRP-konjugiert]	<b>1:25000</b>	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Ziege anti Kaninchen IgG [Cy3-konjugiert]	<b>1:500</b>	Dianova, Hamburg

**Tabelle 3.1.4.3:** Anregungswellenlängen und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome

Fluorochrome	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Cy3	550 nm	570 nm [rot]



### 3.1.5 Oligonukleotide und Vektoren

Die siRNA wurde von Qiagen (Hilden) bezogen.

Tabelle 3.1.5.1: Sequenzen der Oligonukleotide des siRNA-Cocktails

siRNA		Sequenz
antiVILIP1_1	Sense	r(AGC CGU UAG UCU GAA UUA A)dTdT
	Antisense	r(UUA AUU CAG ACU AAC GGC U)dAdA
antiVILIP1_2	Sense	r(CAA AGA UGA CCA GAU UAC A)dTdT
	Antisense	r(UGU AAU CUG GUC AUC UUU G)dAdA
antiVILIP1_3	Sense	r(GUG CGA CAU UCA GAA AUG A)dTdT
	Antisense	r(UCA UUU CUG AAU GUC GCA C)dAdA

Alle Primer wurden von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) synthetisiert.

Tabelle 3.1.5.2: Primer sets used for RT-PCR (bp base pair, s sense; as antisense)

Ziel-cDNA	Zugangsnummer	Primersequenzen in 5' → 3'	Produktgröße in bp
AC-I	XM_001053224.1	s CTG AAS AGG TGC TCA TAC CAG TT as GGC TTC CTT CCC TGC TGC	826
AC-II	NM_031007.1	s GGA GGA AGG AGA YGG TGA GA as CTC CAA AGG AGA AGC CAA GGA	577
AC-III	NM_130779.1	s TTG CYG ACT TCT ACA CTG AGG as CGTG TCC TTC ATG GCT ART GC	283
AC-IV	NM_019285.2	s GCGT YCT CTG TGG AGT CAT YGG as GGA GAA RGA AGA GAA GGA AGG	650
AC-V	NM_022600.1	s GAG GCA GTT CYG TGG CGT CAG as TGG GMG TTG GTG TGC AGA GA	546
AC-VI	NM_012821.2	s GGT TCC CAA AGT GGA TGA ACG as CCT CCT GAT GAA GGC TTC ATC	400
AC-VII	BC115833.1	s ATG GAG AAT GTG AAC CGC CTC C as CTT GCT CAT CAG GGC CAT GCT AA	401
AC-VIII	NM_017142.1	s CAG GCC AAA GAG GAG ATC AAC G as TGA TCT CAT TCA GCA AGC GCA	249
AC-IX	XM_001077332.1	s CTG GAG CAT CTA TTT CGC TGT C as CGA ACA CCA GCA GGG TGA G	166
AC-X	NM_021684.1	s ACC ACC TAC ATC ACA CTC G as TCA ATC ACC TCT CCT TCC	688

Ziel-cDNA	Zugangsnummer	Primersequenzen in 5' → 3'	Produktgröße in bp
<b>NPR-A</b>	NM_008727	s TGC AGA ATG AGC ACT TGA CC as GGC AAT TTC CTG AAG GAT GA	431
<b>NPR-B</b>	NM_173788	s TTG CTG TAT CTG GAT GCT CG as GAT TTG GGG GTT CTC GGT AT	409
<b>Snail</b>	NM_011427	s AGG ACG CGT GTG TGG AGT as GGA GAA TGG CTT CTC ACC AG	320
<b>VILIP-1</b>	NM_012038	s ATG GGG AAR CAG AAT AGC AAA C as TCA TTT CTG MAT GTC KCA CTG CA	550
<b>GAPDH</b>	NM_008084	s ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC as TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	590

Die verwendeten Vektoren wurden auf Basis des PN1-EGFP-Vektors (Clontech) in der Arbeitsgruppe hergestellt.

Tabelle 3.1.5.3: Verwendeter Vektor für die Überexpression von VILIP-1 und Kontrollvektor.

Konstrukt	Eingesetzte Menge / Ansatz	Hersteller
<b>VILIP-1-EGFP-CMV-Vektor</b>	1 µg	AG Braunewell, Spilker et al. 2002
<b>EGFP-CMV-Vektor</b>	1 µg	AG Braunewell, Zhao et al. 2008

### 3.1.6 Zellkulturmodell

Vier murine Plattenepithelkarzinom-(SCC)-Zelllinien der Haut wurden freundlicherweise von Professor Klein-Szanto (Mahloogi et al., 2003) zur Verfügung gestellt und wurden als Modellsystem für alle Untersuchungen verwendet. CC4A und CC4B stammen vom selben Tumor. Injiziert man diese Zellen s.c. in Nacktmäuse, entwickelt sich aus CC4A-Zellen ein SCC oder Spindelzellkarzinom vom Grad IV, aus CC4B-Zellen hingegen entsteht ein gut differenziertes, weniger aggressives SCC von geringerem Grad (Grad II). CH72-Zellen sind nach s.c. Injektion ebenfalls der Ursprung eines Plattenepithelzellkarzinoms von geringem Grad und bei CH72T3-Zellen handelt es sich um eine subklonierte Zelllinie, die durch in vivo Passagieren von CH72-Zellen in Nacktmäusen entstand und zu einem SCC hohen Grades führt. Das Modell besteht somit aus zwei Zelllinien, die ein aggressives Karzinom hohen Grades induzieren und zwei Zelllinien die zu einem differenzierteren, weniger aggressiven Tumor geringeren Grades führen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung der Tumorzelllinien

#### Spezielle Lösungen

Standardmedium: DMEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 u/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Dissoziationslösung: PBS, 0,5% Trypsin-EDTA

Die Kultivierung der SCC-Zellen erfolgte in supplementiertem DMEM in einem Zellkultur-Inkubator (Heraeus, Osterode) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden regelmäßig bei einer Konfluenz von 90% passagiert. Dazu wurden die Zellen in PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die Zellsuspension wurde mit Standardmedium verdünnt, um die Aktivität von Trypsin zu unterbrechen und 5 min bei 1000g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem DMEM aufgenommen und in die Zellen in der gewünschten Dichte wieder ausgesät. Wurde die genaue Zellanzahl bestimmt, geschah dies mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau.

### 3.2.2 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion der SCC-Zellen erfolgte mit Lipofectamin vier bis acht Stunden nach dem Ausplattieren. Der Transfektionsansatz für 500 µl DMEM und maximal  $1 \times 10^5$  Zellen bestand aus 50 µl OptiME M, 1 µl Lipofectamin, und 1 µg Vektor-DNA (Tabelle 3.1.5.3) und wurde laut den Angaben des Herstellers angesetzt. Für größere Volumen oder eine größere Zellanzahl wurde der Ansatz entsprechend angepasst. Zur Verbesserung der Transfektionseffizienz wurde nach 4-6 h ein Mediumwechsel mit Standardmedium vorgenommen. Zur Transfektion von siRNA wurde ein Cocktail aus drei verschiedenen siRNA-Molekülen hergestellt (Tabelle 3.1.5.1), so dass die Gesamtmenge 450 ng betrug. Der Cocktail wurde anschließend anstelle von 1 µg cDNA zum Transfektionsansatz gegeben. Als Kontrolle wurde hierbei scrambled-RNA (scr) in der Konzentration des siRNA Cocktails verwendet.

### 3.2.3 Bestimmung der intrazellulären cAMP bzw. cGMP Konzentration

In 24-Lochplatten wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung ausplattiert und für 24 h bei Standardbedingungen kultiviert. Vor der Messung wurden die Zellen in DMEM mit 1 mM IBMX für 30 min bei 37°C inkubiert und wenn vorgesehen, anschließend die Effektoren (FSK, SNOG, ANP, CNP) für 20 min zugegeben. Die Bestimmung der intrazellulären cAMP bzw. cGMP Konzentration erfolgte mittels der Enzym Immunoassay Kits (EIA, RPN225, RPN 226; Amersham, Uppsala) laut den Angaben des Herstellers.

### 3.2.4 Zell-Matrix-Adhäsionstest

#### Spezielle Lösungen

- Fibronectinlösung: 10 µg/ml Fibronectin in PBS
- Blockierlösung: 1% BSA in PBS, für 50 min bei 56°C hitzeinaktiviert
- Fixierlösung: 4% PFA in PBS
- Kristallviolettlösung: 0.1% Kristallviolett, 0.5% Ethanol in aqua dest.
- Entfärbelösung: 50% Ethanol, 1% Eisessig in aqua dest.

200 µl Fibronectinlösung wurden auf die Oberfläche der Vertiefungen einer 24-Lochplatte gegeben und für 1h bei 37°C zur Adsorption inkubiert. Nach Sättigung der beschichteten Oberfläche mit Blockierlösung für 1 h wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in serumfreiem DMEM mit 0.1% BSA ausplattiert. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37°C wurden nichtadhärente Zellen durch Waschen mit PBS entfernt und adhärente Zellen wurden für 20 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Kristallviolettlösung für 1 h gefärbt und danach wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Mittels 300 µl Entfärbelösung pro Ansatz wurde der gebundene Farbstoff entzogen. Die optische Dichte der Lösung wurde bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Der Wert einer Versuchsbedingung im Experiment wurde doppelt bestimmt und jedes Experiment wurde wenigstens dreimal durchgeführt. Ein Leerwert, basierend auf einer Fibronectin-beschichteten, BSA-blockierten Vertiefung ohne Zellsuspension, wurde von jedem Wert subtrahiert.

### 3.2.5 Zell-Dissoziationsmessung

#### Spezielle Lösungen

Fibronektinlösung: 10 µg/ml Fibronektin in PBS

Blockierlösung: 1% BSA in PBS, für 50 min bei 56°C hitzeinaktiviert

Dissoziationslösung: 0.4% Trypsin/EDTA in PBS

Fixierlösung: 4% PFA in PBS

Kristallviolettlösung: 0.1% Kristallviolett, 0.5% Ethanol in aqua dest.

Entfärbelösung: 50% Ethanol, 1% Eisessig in aqua dest.

$5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung wurden in Fibronektin-beschichtete und blockierte 24-Lochplatten ausplattiert, für 4 h in Standardmedium inkubiert und anschließend mit dem VILIP-1-GFP-Vektor, VILIP-1-siRNA oder den entsprechenden Kontrollen 72 h transfiziert. Danach wurden die Zellen mittels Dissoziationslösung für die angegebenen Zeiten bei 37°C von der Oberfläche abgelöst. Um die Trypsinaktivität zu inhibieren und die abgelösten Zellen zu entfernen, wurden die Platten zweimal mit DMEM mit 10% Serum gewaschen und einmal mit PBS, bevor die noch adhärenen Zellen für 15 min bei RT fixiert wurden. Als Maß für die Menge der haften gebliebenen Zellen wurde die optische Dichte nach Färbung mit Kristallviolett, wie unter 3.2.4 beschrieben, bestimmt. Die Dissoziationsgeschwindigkeit ist bei dieser Versuchsanordnung abhängig vom Lösen der Zell-Matrixverbindungen, aber vor allem vom Abbau der Zell-Zellkontakte, da diese den Zugang für Trypsin zu den Zell-Matrixverbindungen blockieren (Simpson et al., 1993).

### 3.2.6 In-vitro-Analyse der Zell-Migration

$2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung wurden in 24-Lochplatten in Standardmedium ausplattiert. Wenn erforderlich, wurden sie mit VILIP-1-GFP, VILIP-1-siRNA oder den entsprechenden Kontrollen transfiziert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Standardmedium durch Medium mit 1% Serum ausgetauscht und die verschiedenen Effektoren oder Inhibitoren (Abschnitt 3.1.3) hinzugefügt. 1 Stunde später wurde in die Zellschicht mit einer sterilen 200 µl Pipettenspitze eine Wunde gesetzt, die am Boden der Vertiefung markiert wurde. Nach 12 bzw. 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und Ausschnitte der Wundbereiche wurden an einem Inversionsmikroskop von Leica bei einer 100fachen Vergrößerung fotografiert. Mindestens acht repräsentative Wundausschnitte aus drei unabhängigen Experimenten wurden für jede Bedingung aufgenommen und analysiert. Die Migration der Zellen wurde durch Auszählen der in einen Wundausschnitt eingewanderten Zellen quantifiziert.

### 3.2.7 Immunzytochemie und Fluoreszenzintensitätsmessung

#### Spezielle Lösungen

Beschichtungslösung:	0,15 M Borsäure, 100 mg/l Poly-D-Lysin
Fixierlösung:	4% PFA in PBS
Glycinlösung:	25 mM Glycin in PBS
Blockierlösung:	3% BSA, 5% Pferdeserum in PBS
Mowiol (Mounting-Medium):	10% Mowiol, 25% Glycerin, 100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 2,5% DABCO

Für alle Immunzytochemieexperimente wurden die Zellen in einer Dichte von  $3 \times 10^4$  Zellen pro Kulturschalenvertiefung auf beschichteten Glasdeckgläschen ausplattiert und für 24 h in Standardmedium inkubiert. Auf das Fixieren der Zellen für 15 min mit Fixierlösung bei RT folgte zweimaliges Waschen für jeweils 10 min mit Glycin, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. In einer feuchte Kammer wurden die Deckgläschen anschließend für 30 min in Blockierlösung mit 0,1% Triton-X-100 inkubiert und die Zellen somit permeabilisiert. Danach wurden die primären Antikörper verdünnt in Blockierlösung mit Triton-X-100 (siehe Tabelle 3.1.4.1 Primäre Antikörper) auf die Deckgläschen gegeben, über Nacht bei 4°C inkubiert und in den folgenden drei Waschsritten ungebundene Antikörper entfernt. Die Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3.1.4.2 Sekundäre Antikörper und Tabelle 3.1.4.3 Fluorochrome) verdünnt in Blockierlösung wurden lichtgeschützt appliziert und für 1,5 h bei RT im Dunklen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte das Entsalzen in ddH<sub>2</sub>O und das Eindecken mittels Mowiol auf Objektträgern. Abschließend wurden nach einer Trockenzeit von mindestens 2 h bei 4°C zur weiteren Fixierung die Übergänge der Deckgläschen zum Objektträger mit Klarlack ummantelt.

#### Auswertung mittels Fluoreszenzintensitätsmessung

Mikroskop: Laser-Scanningmikroskop (Leica DM LFSA oder DM 2500; Wetzlar, Deutschland) mit Argon-Ion- (488 nm), Helium-Neon- (543 nm) und Helium-Neon- (633 nm) bzw. Festkörper- (488, 532, 635 nm) Laserlichtanregung

Die Visualisierung des Fluorochrom Cy3 erfolgte am Laser-Scanningmikroskop. Das Anregungslicht wurde durch dichromatische Strahlenteiler (DD488/543 für Cy3) eingekoppelt. Das ausgesendete Licht wurde in sequenziellen Rastern im Bereich von 550 nm bis 600 nm zusammengesetzt. Die Einstellung der Lochblende betrug 1 Airy. Es wurden

Öl-Immersion-Objektive verwendet (Leica HCX PL APO 63x/1,4). Bei den Aufnahmen mit 512 x 512 Pixel betrug die räumliche Auflösung 0.37  $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ . Um Bildinformationsverluste zu vermeiden, wurde die geringste Laserintensität, die für ein adäquates Signal-Rausch-Verhältnis notwendig ist, verwendet. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe von Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA) und Image J 1.33u (NIH, USA).

In Image J wurden für alle untersuchten Zellen Diagramme angefertigt, basierend auf der Intensität (Grauwert) der Pixel entlang eines Zellquerschnitts. Jeder Querschnitt wurde so gelegt, dass er durch die Zellmitte verlief und auf beiden Seiten durch Bereiche starker Signalintensität im Bereich der Zellmembran. In einer semiquantitativen Analyse wurde der Quotient aus gemittelten Pixelwerten im Zellmembranbereich (Fläche unter der Kurve im Bereich der Maxima pro Anzahl der Pixelwerte in diesem Bereich) und gemittelten Pixelwerten des ganzen Zellquerschnitts (Fläche unter der Kurve pro Anzahl der Pixel des Zellquerschnitts) für jede Zelle berechnet. Der Zellmembranbereich, der Bereich, in dem das Signal membranständiger Antigene zu erwarten ist, wurde als jeweils 20 Pixel auf beiden Seiten des Zellquerschnitts ab Intensitätswerten größer Null definiert, was auf jeder Seite der Zelle etwa 5  $\mu\text{m}$  um die Zellmembran entspricht.

### 3.2.8 Western Blot Analyse

#### Spezielle Lösungen und Verbrauchsmaterialien:

5x Proteinprobenpuffer:	250 mM Tris (pH 6.8), 7.5% SDS, 30% Glycerol, 1% Mercaptoethanol, 0,25% Bromphenolblau
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris, pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris, pH 6,8
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS
Blotpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,02% SDS, 20% Methanol
TBST-Puffer:	1xTBS-Puffer, 0,1% Tween-20
Blockierlösung:	5% Milchpulver in TBST
Molekulargewichtstandard, vorgefärbt	Fermentas, St. Leon-Rot
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
HyperFilm	Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK
Chemolumineszenzlösungen	Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK
Stripping Buffer	Pierce, Rockford, IL, USA

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen aller zu untersuchenden Lysate erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit nach dem Protokoll des Herstellers.

Beim Western Blot werden in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennte Proteine von diesem Gel auf eine Membran übertragen und dort fixiert. Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich proportional zur Proteingröße an und hat eine negative Eigenladung, welche die Ladungen der Proteine abschirmt und so die Wanderung im elektrischen Feld proportional zur Proteingröße vom Minus- zum Pluspol erlaubt.

5-20%ige Gradiententrenngele mit 5%igen Sammelgelen wurden in Gradientengelkammern von PeqLab (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen) in der folgenden Zusammenstellung gegossen.

Tabelle 3.2.8.1: Chemikalien für die Gelherstellung und ihre Zusammenstellung für Gradientengele.

	<b>Trenngel 20%</b>	<b>Trenngel 5%</b>	<b>Sammelgel 5%</b>
Puffer	5,5 ml (TG-Puffer)	5,5 ml (TG-Puffer)	4 ml (SG-Puffer)
ddH <sub>2</sub> O	--	12 ml	5,3 ml
Acrylamid	11 ml (40%)	2,75 ml (40%)	2,7 ml (30%)
0,2M EDTA	220 µl	220 µl	160 µl
10% SDS	220 µl	220 µl	160 µl
87% Glycerol	5,1 ml	1,3 ml	3,7 ml
TEMED	14,7 µl	14,7 µl	11,5 µl
APS	50 µl	79 µl	92 µl
Farbstoff	Bromphenolblau 20 µl		Phenolrot 20 µl

Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (1970). Die zu analysierenden Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit Proteinprobenpuffer versetzt, für 1-3 min bei 95°C gekocht und mit einer Hamilton- Mikroliterspritze auf das Gradientengel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25 mA für 1,5 h in Elektrophoresepuffer durchgeführt. Der anschließende Transfer der aufgetrennten Proteine aus den Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran erfolgte elektrophoretisch in einer Trans-Blot-Cell (BioRad) gefüllt mit Transferpuffer für 2 h bei 80 mA und 350 V bei 4°C. Freie Bindungsstellen der PVDF-Membran wurden nach dem Transfer für 1 h mit Blockierlösung bei RT blockiert. Alle verwendeten Antikörper (Tabelle 31.4.1) wurden mit TBST-Puffer verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Entfernen ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST folgte die Inkubation mit in



Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörpern (Tabelle 3.1.4.2). Diese waren für die Detektion der Antigene mit Meerrettichperoxidase gekoppelt und erlaubten so die Visualisierung mittels ECL-Detektionssystem, welche nach gründlichem Waschen der Membran in der Dunkelkammer erfolgte. Das Chemolumineszenzsignal wurde durch Exposition eines sensitiven Filmes in einer Kassette auf den Film übertragen und dieser anschließend eingescannt.

An den eingescannten Blots war nun die Densitometrie möglich. Diese wurden dafür in das Programm Image J geladen und dort der Grauwert als Maß für die Signalstärke ermittelt. Die Werte wurden mit den Werten der internen Kontrolle  $\beta$ -Aktin normalisiert und zueinander in Bezug gesetzt.

### 3.2.9 Reverse-Transkriptase-PCR und Agarosegelelektrophorese

#### Spezielle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden
QiaShredder	Qiagen, Hilden
SuperScriptIII-First-Strand-Synthesis Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Oligo-dT-Primer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Taq Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
10mM dNTP Mix	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
DEPCH <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
50-fach TAE-Puffer:	2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA in ddH <sub>2</sub> O
DNA-Probenpuffer	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fragmentlängenstandard (GeneRuler DNA Ladder Mix)	Roth, Karlsruhe

Es wurden PCR Primer entwickelt, die selektiv cDNA der zu untersuchenden Transkripte amplifizieren (Übersicht siehe Tabelle 3.1.5.2 Primer). Primer für Adenylatzyklaseisoformen wurden so designt, dass sie speziesunabhängig sind und für Gesamt-RNA-Extrakte aus Geweben oder Zelllinien von Maus oder Ratte eingesetzt werden können. Jedes RT-PCR Experiment wurde für das jeweilige Transkript mindestens dreimal durchgeführt und Extrakte von Gehirn- oder Testisgewebe wurden als Positivkontrolle genutzt. Gesamt-RNA wurde mittels RNeasy Mini-Kit extrahiert und anschließend mit Oligo(dT) Primern und dem SuperScript III First-Strand-Kit umgeschrieben.

Für die PCR wurden 2 µg Template, 0,2 µM jedes Primers, PCR -Puffer, 0,2 mM dNTP-Mix, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, und 1 U Taq-Polymerase in DEPC-H<sub>2</sub>O als 50µl Reaktionsansatz gemischt. 35 Amplifikationszyklen mit der dem Primerpaar entsprechenden Schmelztemperatur wurden durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde die Reaktion jeweils auch in Abwesenheit der Reversen Transkriptase angesetzt.

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese mit 1,5%igen Agarosegelen in TAE-Puffer durchgeführt. Die cDNA-Proben wurden mit sechsfachem DNA-Probenpuffer versetzt und in einer Elektrophoresekammer horizontal aufgetrennt. Das Hinzufügen von 1 µl Ethidiumbromid zu 100 ml Agarosegelansatz erlaubte die Visualisierung der Fragmente unter UV-Licht und die Überprüfung ihrer Größe im Vergleich zum Fragmentlängenstandard.

### 3.2.10 Bioinformatische Promotoranalyse

Die Sequenzen für die Analyse der Promotorregionen von Integrin α5 (*itga5*), E-Cadherin (*cdh1*), VILIP-1 (*vsnl1*) und snail-1 (*snai1*) wurden über die angegebenen Zugriffsnummern aus der AceView Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly>) entnommen. CRE-sites (TGACGTCA) als Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren CREB, CREM und ATF-1 wurden mittels CREB-Target-Gene-Database (<http://natural.salk.edu/CREB>) vorhergesagt im Sequenzbereich von -5 kb bis 1 kb relativ zum Transkriptionsstart (TS). Die allgemeine Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindungsstellen erfolgte unter Einsatz der Programme Alibaba (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.htm#alibaba2>) im Sequenzbereich von -600 bp bis zum TS und Signal Scan (<http://www.bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/signal>) im Bereich von -5 kb bis zum TS und. Beide Programme basieren auf in der TRANSFAC-Datenbank ([www.gene-regulation.com/pub/databases.html](http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html)) gespeicherten Informationen zu Transkriptionsfaktoren und ihren Bindungsstellen. E-Box-Konsensussequenzen wurden zusätzlich mit der AnnHyb-Software (Version 4.9.33 2005, <http://bioinformatics.org/annhyb>) in den untersuchten Sequenzen ermittelt.

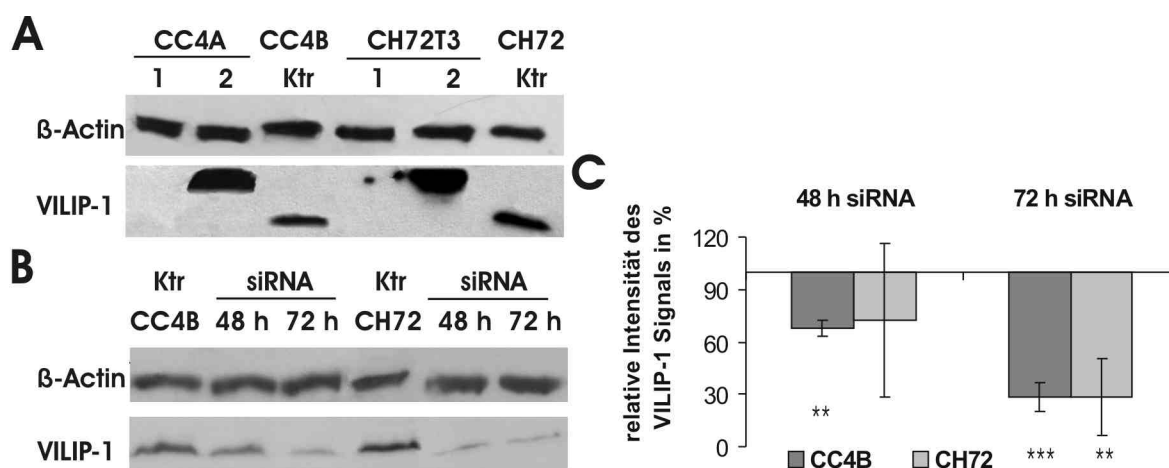
### 3.2.11 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's t-Test für Proben mit ungleicher Varianz eingesetzt. Die Ergebnisse wurden als signifikant eingestuft, wenn ein p-Wert kleiner als 0,05 berechnet wurde (< 0,05: (\*), < 0,01: (\*\*), < 0,001: (\*\*\*)). Alle Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Modulation der VILIP-1-Expression

Für viele Fragestellungen dieser Arbeit war es sinnvoll in den Experimenten die VILIP-1-Expression zu modulieren. Es wurden Überexpressions- und Knock-down-Strategien genutzt um dies zu erreichen. Zunächst wurde sichergestellt, dass die ausgewählten GFP-Vektoren und der zusammengestellte siRNA-Cocktail in der gewünschten Weise die Expression von VILIP-1 erhöhen bzw. verhindern. Abbildung 4.1 zeigt in Teil B und C das Expressionsniveau von VILIP-1 in den VILIP-1-positiven SCC-Zellen 48 Stunden und 72 Stunden nach der Transfektion von 450 ng siRNA-Cocktail. Nach 48 Stunden konnte nur eine 30%ige Abnahme der VILIP-1-Proteinexpression erreicht werden, wohingegen durch 72stündige Inkubation in beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion der Proteinexpression um 70% erzielt wurde. Außerdem ist in Teilabbildung 4.1 A zu sehen, dass 72 Stunden nach Transfektion des GFP-VILIP-1-Vektors in die VILIP-1-negativen Zellen eine starke Expression des Fusionsproteins nachweisbar ist. Daher wurde diese Inkubationszeit für alle Experimente mit Einsatz von siRNA oder VILIP-1-GFP-Vektor übernommen.



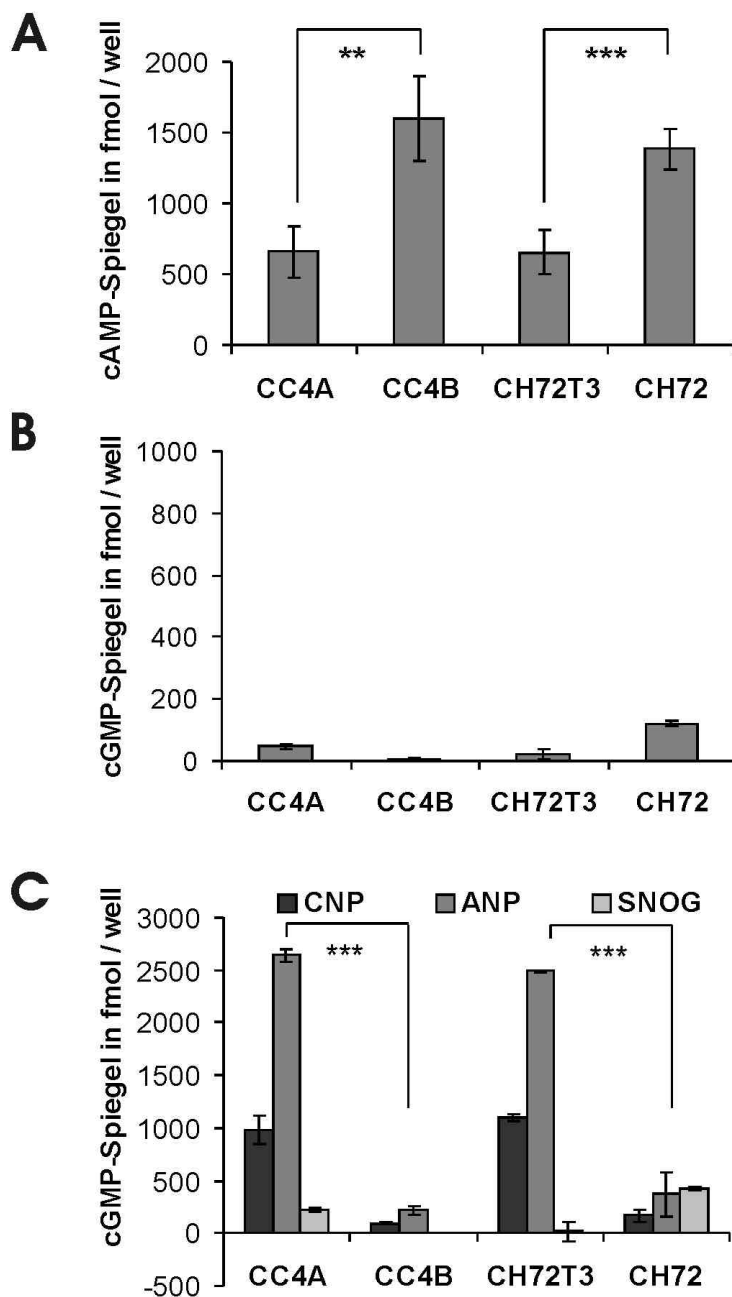
**Abb. 4.1**, Analyse der VILIP-1 Expression in SCC-Zellen. **A**, Western Blot zum Nachweis der VILIP-1-Expression 72 h nach Transfektion von 1 ng GFP-Vektor (1) bzw. GFP-VILIP-1-Vektor (2) in VILIP-1-negative Zellen. **B**, Western Blot von Proteinextrakten der VILIP-1-positiven Zellen nach 48 h oder 72 h Inkubationszeit mit 450 ng siRNA-Cocktail. **C**, Die exprimierte Menge VILIP-1-Protein wurde semiquantitativ bestimmt. Die  $\beta$ -Aktin-Expression fungierte als interne Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Experimenten mit ihren Standardabweichungen als Fehlerindikatoren (CC4B:  $p < 0.0001$ ; CH72:  $p = 0.002$ ).

## **4.2 Bedeutung cAMP- und cGMP-abhängiger Signalwege für das Metastasierungspotential von SCC-Zellen**

Um zu beurteilen inwieweit der Effekt von VILIP-1 auf die intrazelluläre Konzentration der zyklischen Nucleotide cAMP und cGMP die Unterschiede VILIP-1-positiver und VILIP-1-negativer Plattenepithelzelltumorzellen hinsichtlich ihres Metastasierungspotentials bedingt, wurde eine Reihe von Untersuchungen unter Modulation des cAMP- oder cGMP-Spiegels beziehungsweise der VILIP-1-Expression durchgeführt.

### **4.2.1 Messung der Konzentration intrazellulärer zyklischer Nucleotide**

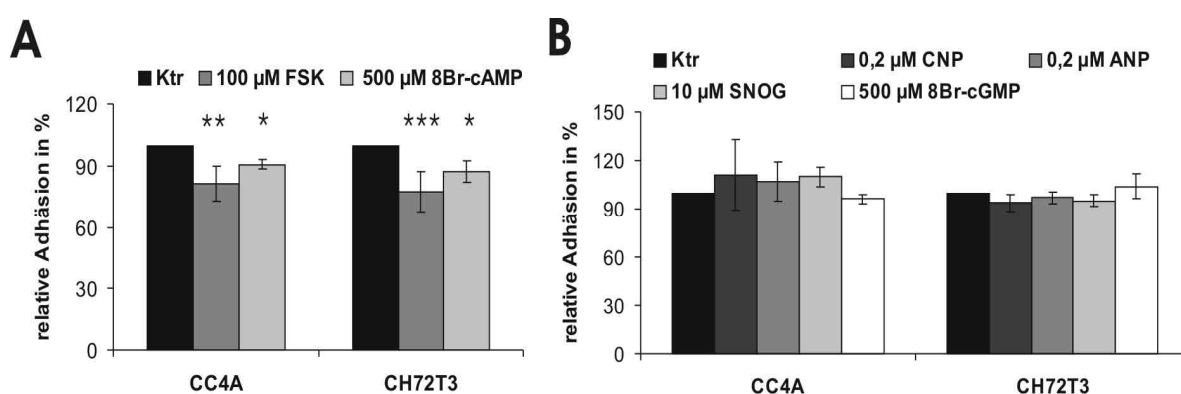
CC4A und CH72T3, die VILIP-1-negativen, aggressiveren Zelllinien weisen einen niedrigeren basalen cAMP-Spiegel auf als die VILIP-1-positiven Zelllinien CC4B und CH72 (Mahloogi et al. 2003). Neben einer cAMP-Akkumulation kann die Expression von VILIP-1 auch eine Akkumulation von cGMP hervorrufen (Braunewell et al. 2001, Brackmann et al. 2005). Daher sollte untersucht werden, ob sich die aggressiven, VILIP-1-negativen Tumorzelllinien und die weniger aggressiven, VILIP-1-positiven sich ebenfalls in ihrem intrazellulären cGMP-Gehalt unterscheiden. Wie Abbildung 4.2.1 A zeigt, konnte der Effekt von VILIP-1 auf die basale intrazelluläre cAMP-Konzentration bestätigt werden. Dagegen wurde in allen Zellen nur ein sehr niedriger basaler cGMP-Spiegel gemessen, der sich nicht mit der VILIP-1 Expression korrelieren ließ (Abb. 4.2.1 B). Die Stimulation der Rezeptorguanylatzyklen NPR-A mit ANP oder NPR-B mit CNP führte jedoch, wie unter Abbildung 4.2.1 C gezeigt, zu einem gut detektierbaren cGMP-Spiegel. Nach Applikation von ANP stieg der cGMP-Spiegel stark an. Dieser Anstieg korrelierte invers mit der Expression von VILIP-1. Das heißt, in den VILIP-1-negativen CC4A-Zellen wurde eine sechsfach höhere cGMP-Zunahme ermittelt als in den VILIP-1-positiven CC4B-Zellen und in den CH72T3-Zellen sogar eine zehnfach höhere Zunahme als in CH72-Zellen. Auch die Inkubation mit CNP führte zu einer cGMP-Akkumulation, die in den VILIP-1 negativen Zellen deutlich stärker ausfiel, in allen Zelllinien aber schwächer war, als nach Applikation von ANP. Die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase mit SNOG führte ebenfalls zu einer erhöhten zytosolischen cGMP-Konzentration. Dieser Anstieg ließ sich aber wie der basale cGMP-Spiegel nicht mit der VILIP-1-Expression korrelieren.



**Abb. 4.2.1** Messung der intrazellulären cAMP- bzw. cGMP-Konzentration in den verschiedenen SCC Zelllinien. **A**; basaler intrazellulärer cAMP-Spiegel ( $p = 0,003$ ,  $p = 0,0005$ ). **B**, basaler intrazellulärer cGMP-Spiegel. **C**, cGMP-Messung nach vorhergehender Stimulation der membranständigen Guanylatzyklasen NPR-A mit ANP bzw. NPR-B mit CNP sowie der löslichen Guanylatzyklase mit SNOG für 20 min ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ). Die Balken geben jeweils den Mittelwert aus mindestens drei Experimenten an. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung.

## 4.2.2 Analyse der Zell-Matrixadhäsion

Als nächstes sollte der Einfluss der zyklischen Nukleotide auf das Metastasierungspotential beurteilt werden. Für VILIP-1 exprimierende SCC-Zellen konnte ein reduziertes Adhäsions- und Invasionsvermögen vermittelt über die induzierte cAMP-Akkumulation nachgewiesen werden (Gonzalez Guerrico et al., 2005; Mahloogi et al., 2003). Daher wurde untersucht, wie sich eine Erhöhung der cAMP- oder cGMP-Konzentration in VILIP-1-negativen Zelllinien auf Adhäsion, Dissoziation und Migration als Teilaspekte der Metastasierung auswirken.



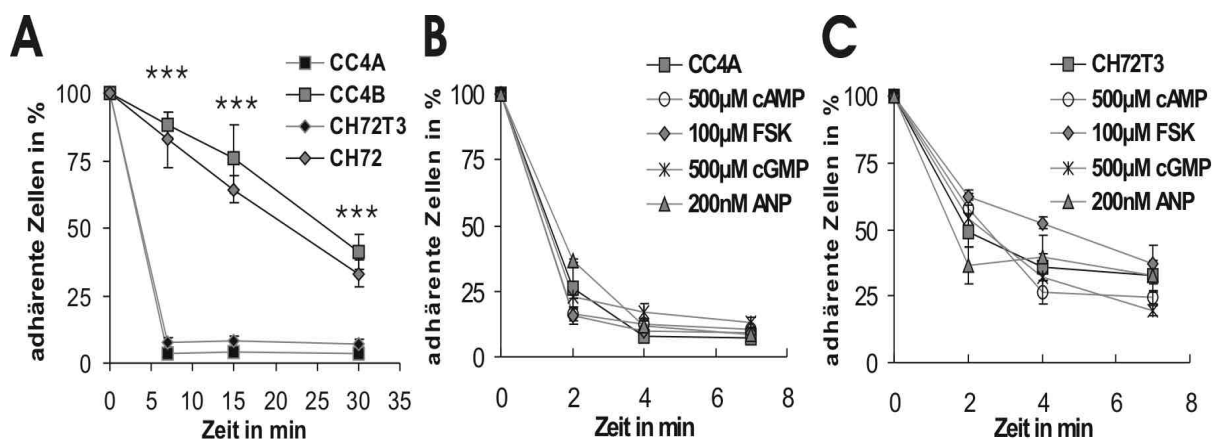
**Abb. 4.2.2.** Einfluss von cAMP und cGMP auf die Adhäsion von SCC-Zellen.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in Fibronectin-beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert und zur Adhäsion für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nicht adhärenzte Zellen wurden entfernt und adhärenzte gefärbt und analysiert. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten bei denen jeder Wert doppelt bestimmt wurde, Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. **A**, Adhäsion der VILIP-1-negativen Zelllinien nach Präinkubation mit Forskolin (FSK) (CC4A:  $p = 0,003$ , CH72T3:  $p = 0,0008$ ) oder 8Br-cAMP (CC4A:  $p = 0,048$ , CH72T3:  $p = 0,018$ ) über Nacht. **B**, Adhäsion der VILIP-1-negativen Zelllinien nach Präinkubation mit Reagenzien, die den cGMP-Spiegel erhöhen.

Abbildung 4.2.2 zeigt die Ergebnisse der Adhäsionsassays, in denen die cAMP- bzw. cGMP-Konzentration moduliert wurde. Die Präinkubation der invasiven Zelllinien CC4A und CH72T3 mit Forskolin oder 8Br-cAMP 24 Stunden vor der Durchführung von Adhäsionsassays in einer signifikanten Reduktion der Anzahl adhärenzter Zellen auf Fibronectinsubstrat nach einer Stunde Adhäsionszeit resultierte (Abb. 4.2.2 A, CC4A: FSK 81 %,  $p = 0,003$ ; 8Br-cAMP 91%,  $p = 0,048$ ; CH72T3: FSK 77%,  $p = 0,0008$ ; 8Br-cAMP 87%,  $p = 0,018$ ). Dagegen konnte durch Präinkubation mit Reagenzien, die den cGMP-Spiegel erhöhen, keine signifikante Veränderung der Adhäsionsfähigkeit VILIP-1-negativer Zellen bewirkt werden (Abb. 4.2.2 B).

### 4.2.3 Modulation des Dissoziationsverhaltens der SCC-Zellen

Als weiteres Charakteristikum des Metastasierungspotentials und der Aggressivität von Tumorzellen sollte das Dissoziationsverhalten der SCC-Zellen untersucht werden. Dieses ist sowohl vom Lösen der Zell-Matrix-Verbindungen, als auch vom Abbau der Zell-Zell-Kontakte abhängig, da die Zelldichte beim Aussäen so gewählt wurde, dass Zell-Zellkontakte bzw. Zellkolonien ausgebildet werden konnten. In den Experimenten wurde folglich gemessen, wie leicht sich die Zellen in Abhängigkeit des cAMP- oder des cGMP-Spiegels mittels Trypsin-EDTA vom Fibronectin-beschichteten Untergrund und von ihren Nachbarzellen lösen lassen.

Wie Abbildung 4.2.3 A zeigt, war bei den VILIP-1-negativen Zelllinien mit größerem Metastasierungspotential eine raschere Dissoziation zu beobachten. Bereits nach fünf Minuten hatten sich über 80% der Zellen gelöst. Bei den VILIP-1-positiven Zellen hingegen wurde erst nach 30minütiger Inkubation mit Trypsin-EDTA in gleicher Konzentration das Ablösen von 60% bis 70% der Zellen erreicht. Dabei konnte auch beobachtet werden, dass VILIP-1-positive Zellen länger den Kontakt zueinander und die für Plattenepithelzellen typische Zellform aufrecht erhalten.

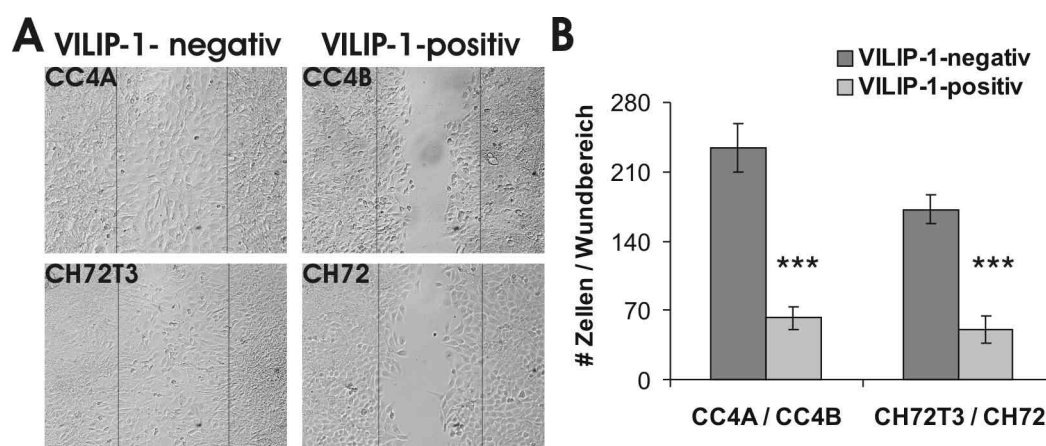


**Abb. 4.2.3**, Dissoziationsverhalten der SCC-Zellen über die Zeit. Die Zellen wurden mittels 0.4% Trypsin/EDTA bei 37°C gelöst und zu verschiedenen Zeiten die Anzahl noch adhärenter Zellen bestimmt. Alle Diagramme zeigen die Mittelwerte aus drei Experimenten und die Standardabweichung als Fehlerindikator. **A**, Vergleich des prozentualen Anteils adhärenter Zellen nach  $t = 7, 15$  und  $30$  min in Bezug auf  $t = 0$  min aller SCC-Zelllinien ( $p < 0,0001$  für alle Zeitpunkte). **B**, **C** Bestimmung der Dissoziation VILIP-1-negativer Zellen (B: CC4A; C: CH72T3) nach Inkubation mit den angegebenen Substanzen zu den Zeitpunkten  $t = 2, 4$ , und  $7$  min.

Durch 24stündige Inkubation mit Reagenzien, die den cAMP- beziehungsweise cGMP-Spiegel erhöhen, sollte versucht werden in den aggressiven Zellen der im Vergleich beträchtlichen Dissoziationsgeschwindigkeit entgegenzuwirken. Es wurde bei der Messung ein der schnellen Dissoziation angepasster Beobachtungszeitraum von zwei bis sieben Minuten gewählt (Abb. 4.2.3 B und C). Weder 8Br-cAMP oder Forskolin, die den cAMP-Spiegel erhöhen, noch 8Br-cGMP oder ANP, die den cGMP-Spiegel erhöhen, wirkten sich signifikant auf das Ablöseverhalten der VILIP-1-negativen Zellen aus.

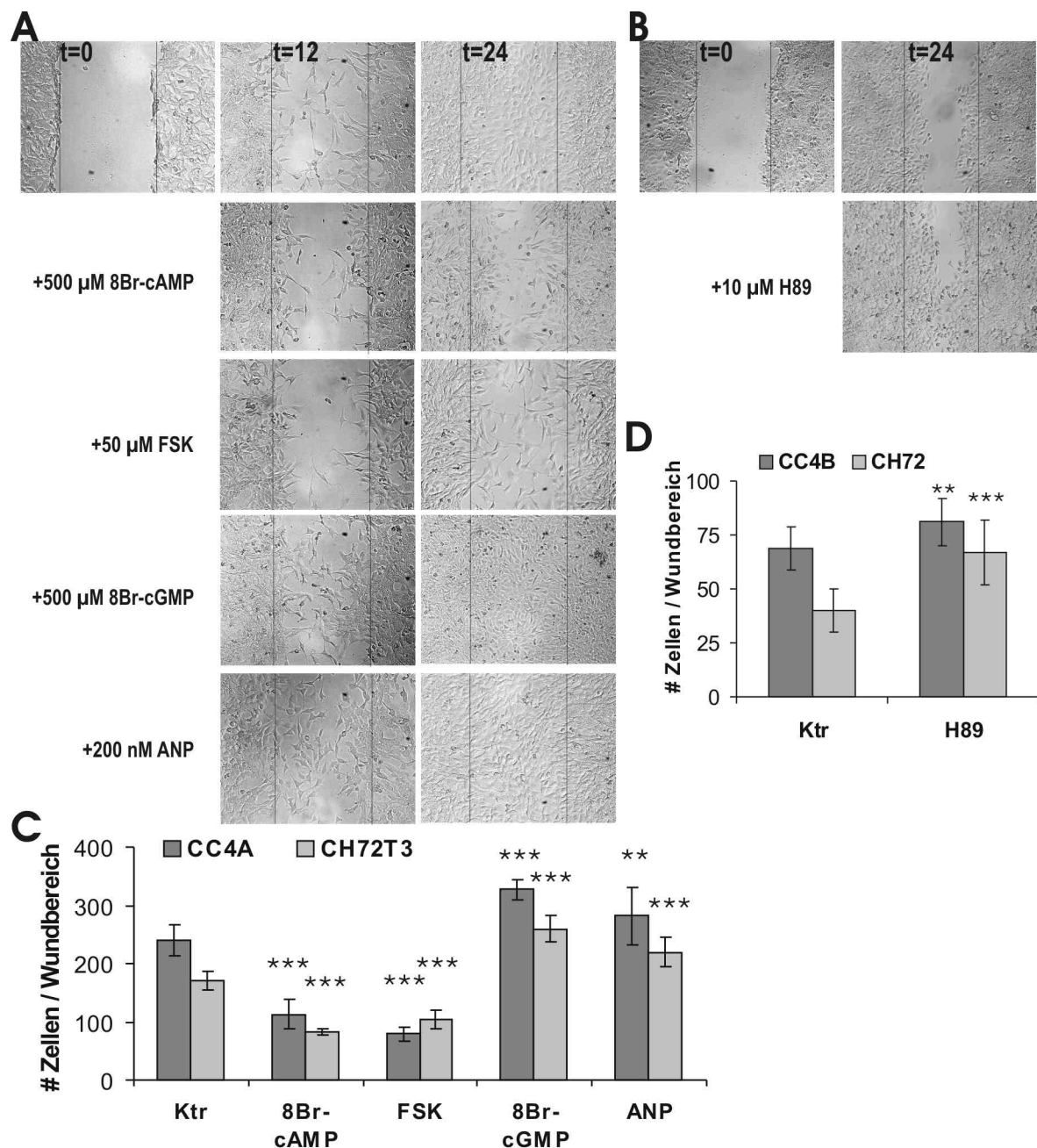
#### 4.2.4 Untersuchung des Migrationsverhaltens der SCC-Zellen

Von großer Bedeutung für die Metastasierung von Tumorzellen ist ihre Motilität. *In vitro* Verwundungstests wurden zur Bestimmung des Migrationsverhaltens herangezogen. Durch das Auszählen der in einen gesetzten Wundbereich eingewanderten Zellen kann das Wundheilungsvermögen und die zu Grunde liegende Migration quantifiziert werden.



**Abb. 4.2.4.1**, Überblick über das Migrationsverhalten der SCC-Zellen. In konfluente Einzelschichten der Zellen wurden Wunden gesetzt und anschließend nach 24 h die Migration in den Wundbereich ermittelt. **A**, Darstellung repräsentativer Wundbereiche der vier verschiedenen Tumorzelllinien 24 h nach dem Setzen der Wunden (Linien markieren den Wundbereich zum Zeitpunkt  $t = 0$ ). **B**, Quantifizierung der Migration. Die Zahl der in einen Wundausschnitt eingewanderten Zellen wurde jeweils für mindestens 8 Wundbereiche aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt (CC4B:  $p < 0.0001$ ; CH72:  $p < 0.0001$ ).





**Abb. 4.2.4.2,** Beeinflussung der Migration durch Modulatoren des cAMP- oder cGMP-Signalweges. Es wurden mindestens acht Wundbereiche aus drei unabhängigen Experimenten ausgezählt und Mittelwerte sowie Standardabweichungen in den Diagrammen dargestellt. **A,** Darstellung repräsentativer Wundbereiche der VILIP-1-negativen Zelllinie CC4A 12 h und 24 h nach Inkubation mit Substanzen, die den cAMP- oder cGMP-Spiegel erhöhen (Linien markieren die Wundbereiche zum Zeitpunkt  $t = 0$ , FSK = Forskolin). **C,** Quantifizierung der Migration VILIP-1-negativer Zellen nach Inkubation mit den angegebenen Substanzen (CC4A: ANP  $p = 0,009$ , 8Br-cAMP, FSK, 8Br-cGMP  $p < 0,0001$ ; CH72T3:  $p < 0,0001$  für alle Bedingungen). **B,** Repräsentative Wundbereiche der VILIP-1-positiven Zelllinie CC4B nach 24-stündiger Inkubation mit H89, einem PKA-Inhibitor, (Linien markieren die Wundbereiche zum Zeitpunkt  $t = 0$ ). **D,** Quantifizierung der Migration VILIP-1-positiver Zellen nach Inkubation mit H89 (CC4B:  $p = 0,007$ ; CH72:  $p = 0,003$ ).

Die in Abbildung 42.4.1 dargestellten Experimente zeigten, dass bei den aggressiveren VILIP-1-negativen Zelllinien sehr schnell einzelne Zellen in den Wundbereich einwandern (siehe dazu auch Abb. 42.4.2 A) und gesetzte Wunden bereits nach 24 Stunden wieder vollständig geschlossen wurden. Im Unterschied dazu wandern die VILIP-1-positiven, weniger aggressiven Zellen nur sehr langsam in den Wundbereich ein. Dabei bewegen sich die Ränder der Wundbereiche als geschlossene Front aufeinander zu, einzelne in den Wundbereich migrierende Zellen konnten nur selten beobachtet werden.

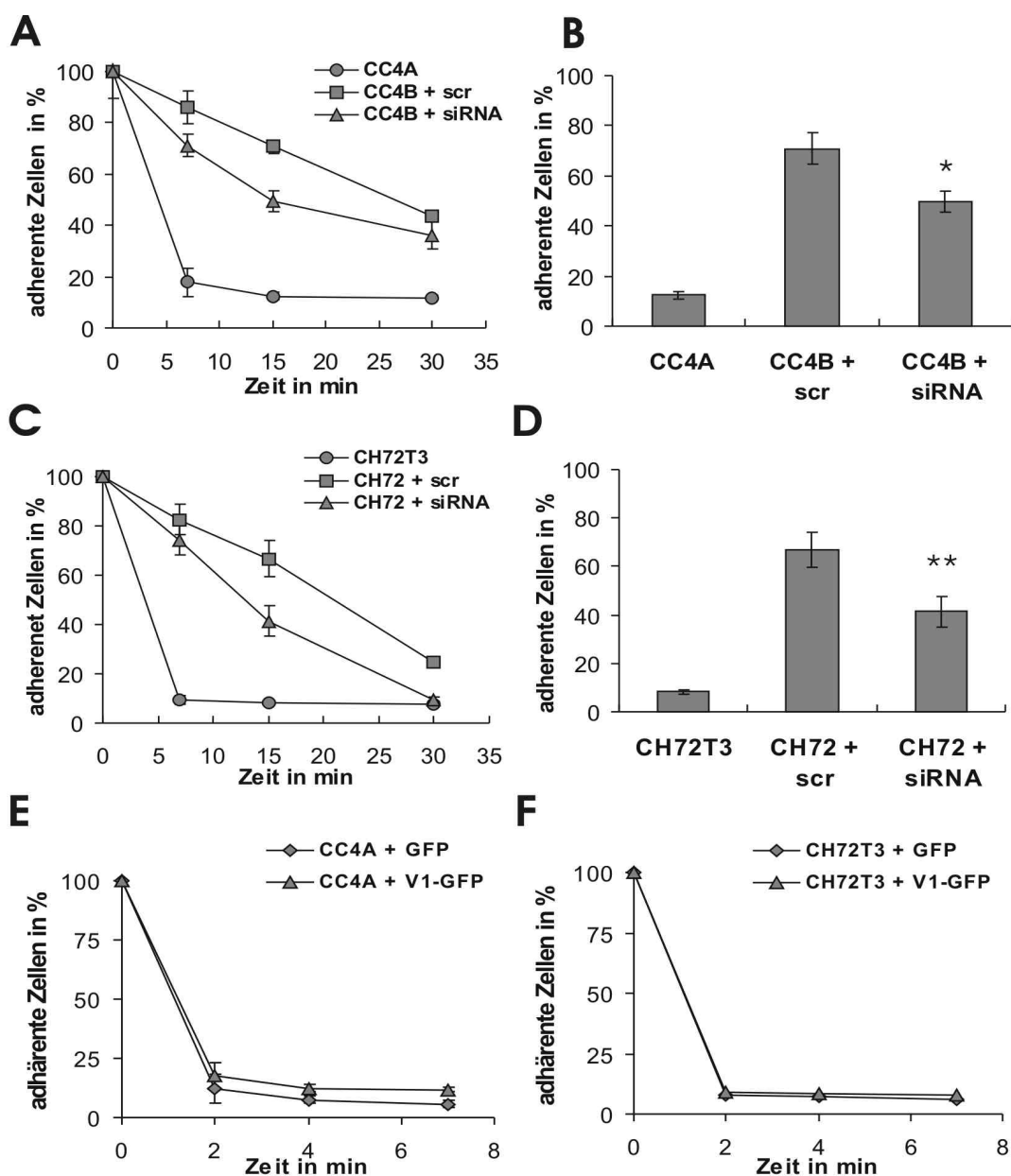
Abbildung 4.2.4.2 zeigt die Ergebnisse der unter Modulation der von den zyklischen Nukleotiden abhängigen Signalwege. Die Inkubation mit 8Br-cAMP oder Forskolin führte jeweils zu einer signifikanten Verminderung der Anzahl migrierender Zellen, wohingegen die Inkubation mit 8Br-cGMP oder ANP das entgegengesetzte Resultat zur Folge hatte, sowohl nach 12 Stunden, als auch nach 24 Stunden (Abb. 4.2.4.2 A und C). Außerdem wurde überprüft, ob die Inhibition von Proteinkinase A, als Effektor von cAMP, durch H89 Einfluss auf die Motilität der VILIP-1-positiven Zellen haben. Wie in Abbildung 4.2.4.2 B und D zu sehen ist, erhöht die Inhibition von Proteinkinase A die Anzahl der in den Wundbereich eingewanderten Zellen signifikant (CC4B:  $p = 0,007$ ; CH72:  $p = 0,003$ ). Es erhöht sich auch leicht die Anzahl von Zellen, die einzeln und losgelöst vom Zellverband im Wundbereich liegen, wobei generell das Schließen der Wunde durch das aufeinander Zuwandern der Wundränder erhalten bleibt.

#### 4.2.5 Dissoziation in Abhängigkeit von VILIP-1

Um festzustellen, ob das beobachtete Dissoziationsverhalten der SCC-Zellen zwar unabhängig von der intrazellulären Konzentration der zyklischen Nukleotide ist, aber dennoch durch VILIP-1 beeinflusst wird, wurde das Ablöseverhalten der Hauttumorzellen unter Modulation der VILIP-1-Expression analysiert.

Wie Abbildung 4.2.5 zeigt, wirkte die Expressionssuppression von VILIP-1 durch 72stündige Inkubation mit dem siRNA-Cocktail der langsameren Dissoziation der CC4B- und CH72-Zellen entgegen. Bei der Zelllinie CC4B hatten sich in Folge der siRNA-Gabe nach 15 Minuten Dissoziationszeit 50% der Zellen gelöst, im Unterschied zu 25% abgelöster Zellen nach 15 Minuten ohne VILIP-1-Suppression (Abb. 4.2.5 B,  $p = 0,013$ ). Bei CH72-Zellen konnte nach 15minütiger Inkubation mit Trypsin-EDTA ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Anzahl noch adhärenter Zellen zwischen den siRNA-behandelten Zellen (60% dissoziiert) und den mit der Kontrolle transfizierten Zellen (35% dissoziiert) festgestellt werden (Abb. 4.2.5 D,  $p = 0,0098$ ). Die Reduktion der VILIP-1-Expression führte bei beiden

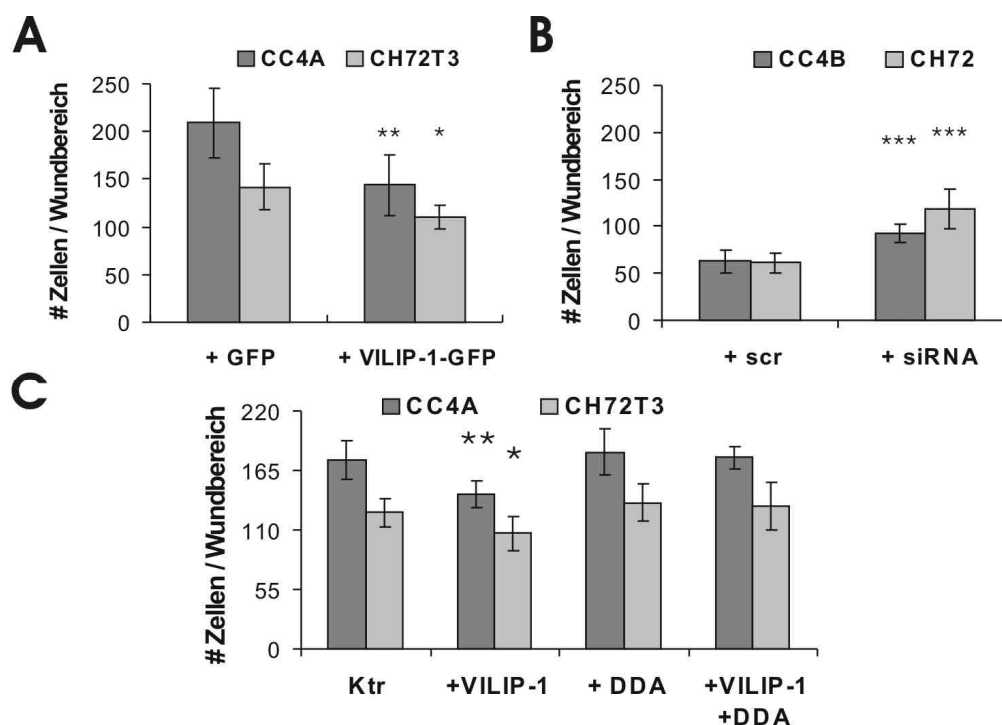
Zelllinien jedoch nicht zum einem derart rapiden Ablöseverhalten wie es bei ihren VILIP-1-negativen Gegenstücken beobachtet werden konnte. In diese Zellen wiederum bewirkte die Überexpression von VILIP-1-GFP keine feststellbare Veränderung im Dissoziationsverhalten.



**Abb. 4.2.5**, Dissoziationsverhalten der SCC-Zellen in Abhängigkeit von der Expressionsstärke von VILIP-1. Die Zellen wurden mittels 0.4% Trypsin/EDTA bei 37°C gelöst und zu verschiedenen Zeiten die Anzahl noch adhärenter Zellen bestimmt. Alle Diagramme zeigen die Mittelwerte aus drei Experimenten und die Standardabweichung als Fehlerindikator. **A, C** Bestimmung der Dissoziation VILIP-1-positiver Zellen nach Transfektion der siRNA bzw. scr-RNA zu den Zeiten  $t = 7, 15$  und  $30$  min in Bezug auf  $t = 0$  min. **B, D** Darstellung noch adhärenter Zellen nach  $15$  min Dissoziation (A, B: CC4A und CC4B,  $p = 0.013$ ; C, D: CH72T3 und CH72,  $p = 0.0098$ ). **E, F** Bestimmung der Dissoziation VILIP-1-negativer Zellen nach Überexpression von GFP-VILIP-1 bzw. nur GFP zu den Zeitpunkten  $t = 2, 4$ , und  $7$  min.

## 4.2.6 Migrationsvermögen in Abhängigkeit von VILIP-1

Abschließend sollte in zusätzlichen Wundheilungsstudien untersucht werden, wie sich die Modulation der VILIP-1-Expression auf das Migrationsvermögen der Hauttumorzellen auswirkt.



**Abb. 4.2.6,** Auswirkung der Expressionsstärke von VILIP-1 auf die Migration in *in vitro* Verwundungstest. In konfluente Einzelschichten von Zellen mit unterschiedlicher VILIP-1 Expressionsstärke wurden Wunden gesetzt und nach 24 h die Migration gemessen. **A,** Quantifizierung der Migration VILIP-1-negativer Zellen nach Transfektion des Kontrollvektors bzw. VILIP-1-GFP-Vektors (CC4A:  $p = 0,002$ , CH72T3:  $p = 0,019$ ). **B,** Quantifizierung der Migration VILIP-1-positiver Zellen nach Transfektion von siRNA bzw. scr-RNA (CC4B:  $p = 0,0002$ , CH72:  $p < 0,0001$ ). **C,** Migration bei modulierter Expression von VILIP-1 und unter Einsatz von DDA, einem generellen Adenylatzyklaseinhibitor, in VILIP-1-negativen Zellen (CC4A: +VILIP-1  $p = 0,0013$ , +VILIP-1 + DDA  $p = 0,75$ ; CH72T3: +VILIP-1  $p = 0,017$ , +VILIP-1 + DDA  $p = 0,49$ ). Die Zahl der in einen Wundausschnitt eingewanderten Zellen wurde jeweils für mindestens 8 Wundbereiche aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt

In Abbildung 4.2.6 A und B ist die Quantifizierung der Migration nach 24 Stunden unter Modulation der VILIP-1-Expression dargestellt. Die Transfektion der VILIP-1-negativen Zellen mit dem VILIP-1-GFP-Vektor reduzierte signifikant die Anzahl der in den Wundbereich

eingewanderten Zellen (Abb. 4.2.6 A) allerdings nicht bis auf das Niveau der VILIP-1-positiven Zellen. Wurden diese 72 Stunden vor dem Setzen der Wunden mit dem VILIP-1-spezifischen siRNA-Cocktail transfiziert, migrierten anschließend signifikant mehr Zellen in den Wundbereich (Abb. 4.2.6 B). Die Suppression der VILIP-1-Expression reichte nicht aus, um die Anzahl migrierender Zellen auf die für VILIP-1-negative Zellen ermittelten Werte zu erhöhen.

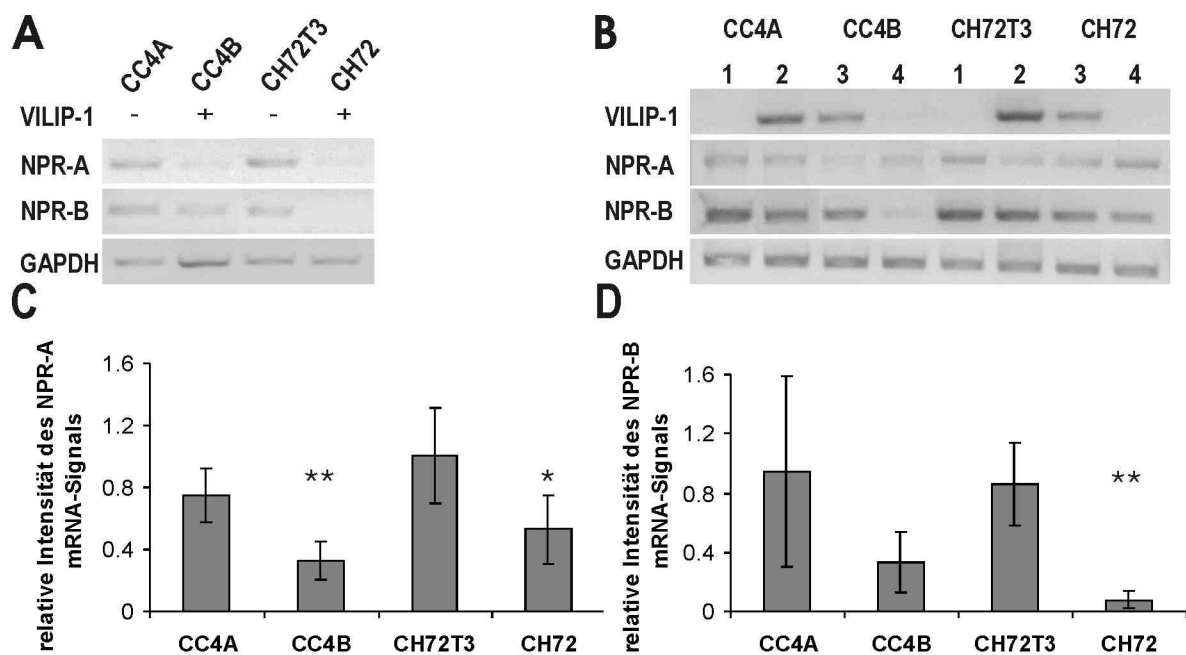
Um zu zeigen, dass die durch VILIP-1 hervorgerufene Auswirkung auf die Migration über cAMP-abhängige Signalwege vermittelt wird, wurde in Wundheilungsstudien mit VILIP-1-GFP-transfizierten Zellen der allgemeine Adenylatzyklase-Inhibitor DDA eingesetzt (Abb. 4.2.6 C). Die Inhibition hatte keinen Effekt auf das Migrationsvermögen der mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen, verhinderte aber die Reduktion der Migration nach Transfektion VILIP-1-negativer Zellen mit dem VILIP-1-GFP-Vektor.

#### 4.2.7 Analyse der Expression der partikulären Guanylatzyklasen

Es stellte sich nun die Frage, ob die beobachteten Eigenschaften der Plattenepithelkarzinomzellen und die Effekte der cAMP- bzw. cGMP-Modulation ursächlich mit der Expression von VILIP-1 in Verbindung stehen.

Ein möglicher Effekt von VILIP-1 auf die Expressionsstärke der partikulären Guanylatzyklasen würde die gemessenen cGMP-Konzentrationen nach Stimulation dieser Enzyme erklären. In einer RT-PCR-Analyse mit spezifischen Primern für NPR-A und NPR-B wurde daher das Expressionsniveau der Guanylatzyklasen in allen SCC-Zelllinien und in Abhängigkeit von der VILIP-1-Expression bestimmt.

Wie Abbildung 4.2.7 zeigt, ergab die Analyse, dass die Expression beider Guanylatzyklase-Isoformen in den Zellen ohne VILIP-1-Expression CC4A und CH72T3 im Vergleich zu den VILIP-1-exprimierenden Zellen signifikant erhöht ist (Abb. 4.2.7 A, C und D; NPR-A: CC4A  $p = 0,009$ , CH72  $p = 0,048$ ; NPR-B: CH72  $p = 0,009$ ). In den Zelllinien CC4B und CH72 waren nur wenige oder gar keine Transkripte für NPR-A und NPR-B nachweisbar. Die Erhöhung der VILIP-1-Expression in den VILIP-1-negativen Zellen bzw. ihre Reduktion in den VILIP-1-positiven Zellen führte jedoch nicht zu einer entsprechend korrelierten Veränderung in der Menge an NPR-A- und NPR-B-Transkripten (Abb. 4.2.7 B).

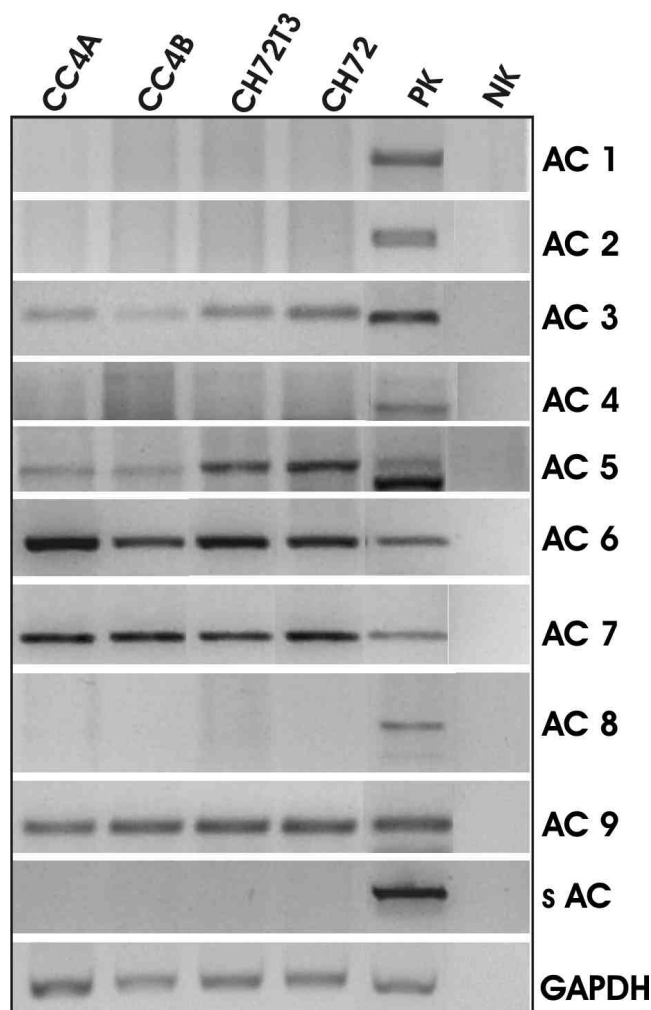


**Abb. 4.2.7,** RT-PCR Analyse der Expression von Guanylatzyklase A (NPR-A) und B (NPR-B) in SCC-Zellen. **A,** RT-PCR mit Template-RNA aus den verschiedenen Zelllinien, amplifiziert mit Primern für NPR-A und NPR-B sowie GAPDH als interne Kontrolle. **C, D** Durch semiquantitative Analyse von drei unabhängigen RT-PCR-Experimenten ermittelter Expressionsspiegel von NPR-A und NPR-B. Die Intensitätswerte wurden mit denen von GAPDH normalisiert. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung (NPR-A: CC4A  $p = 0,009$ , CH72  $p = 0,048$ ; NPR-B: CH72  $p = 0,009$ ). **B,** RT-PCR-Analyse des Transkriptoms von SCC-Zellen, deren VILIP-1 Expression moduliert wurde (1: +GFP, 2: +VILIP-1-GFP, 3: +scr RNA, 4: + VILIP-1-siRNA).

#### 4.2.8 Analyse des Expression der Adenylatzyklase-Isoformen

Dem ermittelten höheren basalen cAMP-Spiegel in VILIP-1-positiven Zellen könnte ebenfalls eine verstärkte Expression bestimmter Adenylatzyklase-Isoformen zu Grunde liegen. Um zu ermitteln, welche Isoformen in den Plattenepithelzelllinien exprimiert werden, und ob sich ihr Expressionsniveau in VILIP-1-positiven und VILIP-negativen Zellen unterscheidet, wurde ein RT-PCR-Screening für alle zehn Adenylatzyklasen durchgeführt.

Abbildung 4.2.8 ist zu entnehmen, dass die Transkripte der Isoformen 3, 5, 6, 7 und 9 in allen SCC Zelllinien nachweisbar waren. Es konnte keine Korrelation zwischen dem Expressionsniveau einer der AC-Isoformen und VILIP-1 festgestellt werden.



**Abb. 4.2.8 A;** RT-PCR Analyse des Expressionsmusters der Adenylatzyklase-Isoformen 1 bis 10 (sAC) in SCC-Zellen. Das Transkriptom von Hirn- oder Testisgewebe der Maus wurde als Positivkontrolle (PK) genutzt. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse aus jeweils mindestens drei verschiedenen RT-PCR Experimenten für jede Isoform.

Das in den Hauttumorzellen gefundene Expressionsmuster wurde außerdem mit dem aus anderen Zelllinien verglichen, von denen bekannt ist, dass die Expression von VILIP-1 zur Akkumulation von cAMP führt.

Tabelle 4.2.8 gibt eine Übersicht über die exprimierten Isoformen in unterschiedlichen Zelltypen. Der Vergleich der Expressionsmuster der Adenylatzyklase-Isoformen in den verschiedenen Zelltypen ergab, dass in allen Zellen, die eine gesteigerte cAMP-Akkumulation nach VILIP-1-Expression aufweisen, die Isoformen 3, 6 und 9 exprimiert werden. In PC12-Zellen, in denen bisher dieser Effekt nicht nachgewiesen wurde (Braunewell and Gundelfinger, 1997), werden diese Isoformen allerdings auch exprimiert.

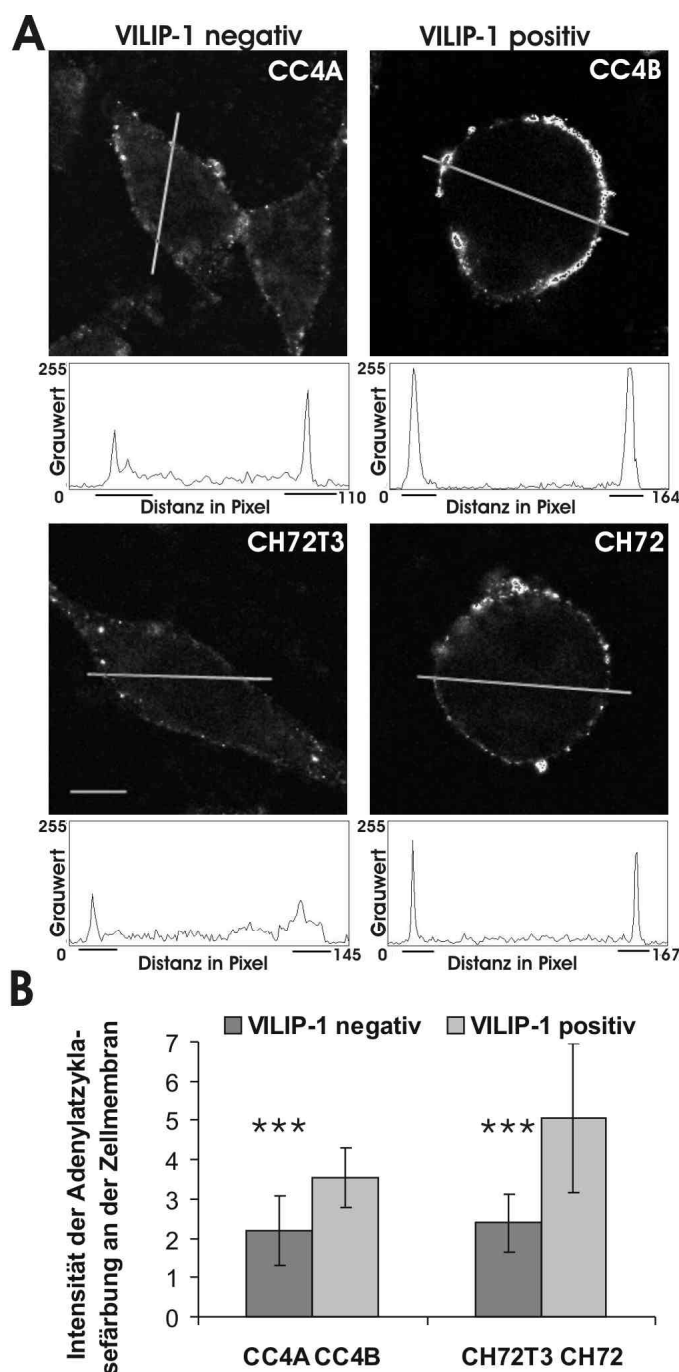
**Tabelle 4.2.8,** Übersicht über die exprimierten Adenylatzyklaseisoformen und den ermittelten Effekt der Expression von VILIP-1 auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Plattenepithelzellkarzinomzellen der Haut (SCC), Gliomazellen (C6), Phäochromozytomzellen (PC12) und primären hippocampalen Neuronen (HN).

AC-Isoform	SCC	C6-Glioma	Primäre HN	PC12
1	-	-	+	+
2	-	-	+	-
3	+	+	+	+
4	-	+	+	-
5	+	-	+	
6	+	+	+	+
7	+	+	+	
8	-	-	+	-
9	+	+	+	+
10	-	-	-	-
cAMP-Akkumulation	+	+	+	-

#### 4.2.9 Subzelluläre Lokalisierung der Adenylatzyklasen

Als weitere Ursache für eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration kommt, wie bei anderen Oberflächenrezeptoren (Brackmann et al., 2005; Lin et al. 2002; Zhao et al., 2009; Chaumont et al., 2008), die Beeinflussung der Oberflächenexpression der Adenylatzyklasen durch VILIP-1 infrage. Die subzelluläre Verteilung der Adenylatzyklasen wurde daher anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen basierend auf Färbungen mit einem allgemeinen Adenylatzyklaseantikörper, der gegen eine konservierte intrazelluläre Region gerichtet ist, untersucht. Es konnte in den SCC-Zellen eine punktförmige Membranfärbung und eine leichte somatische Immunreaktivität beobachtet. Wie Abbildung 4.2.9 zeigt, ergab die Analyse der Signalintensität entlang eines Zellquerschnitts von 25 Zellen jeder der vier Zelllinien, dass die Fluoreszenzintensität des Adenylatzyklasesignals im Bereich der Zellmembran relativ zur Fluoreszenzintensität über den gesamten Zellquerschnitt in den VILIP-1-positiven Zelllinien CC4B und CH72 signifikant erhöht ist (CC4A/CC4B  $p < 0,0001$ , CH72T3/CH72  $p = 0,0008$ ).





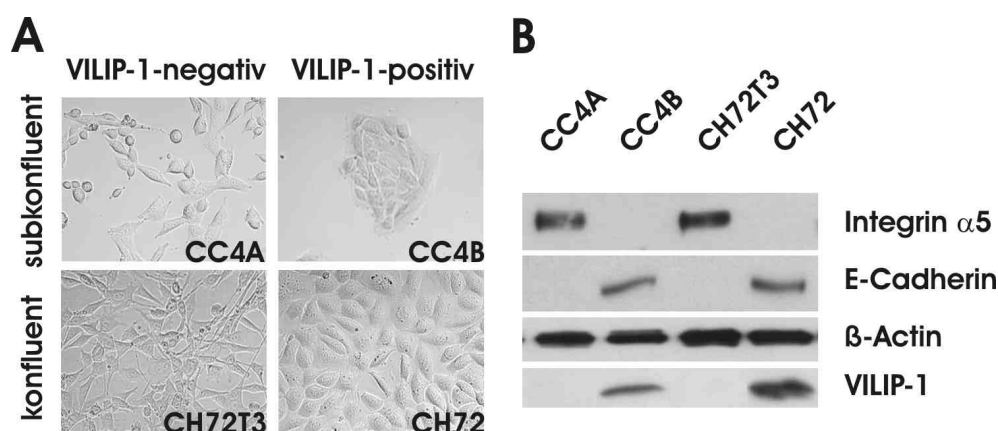
**Abb. 4.2.9:** Einfluss der VILIP-1 Expression auf die subzelluläre Verteilung der Adenylatzyklen in SCC-Zellen. Die Bilder wurden nach immunzytochemischer Analyse mit ACcomm-AK am konfokalen Mikroskop aufgenommen und in Image J analysiert (Balken im Bild CH72T3 = 10  $\mu$ m). Die Diagramme unter den Bildern zeigen die relative Fluoreszenzintensität des Adenylatzyklasesignals entlang des mit der weißen Linie markierten Schnittes durch die jeweilige Zelle. Die schwarzen Balken in den Diagrammen repräsentieren den definierten Bereich der Zellmembran von 20 Pixeln auf jeder Seite der Zelle. **B**, Bestimmung des Verhältnisses von Fluoreszenzintensität im Bereich der Membran zu Fluoreszenzintensität entlang des Zellquerschnitts durch semiquantitative Analyse der in den Diagrammen dargestellten Signalintensitätswerten (CC4A/CC4B  $p < 0,0001$ , CH72T3/CH72  $p = 0,0008$ ,  $n = 25$ ).

## 4.3 Untersuchungen zur Rolle von VILIP-1 bei der Tumorprogression

Außer den beschriebenen Unterschieden in Aggressivität und Invasivität fielen beim Kultivieren VILIP-1-exprimierender und nicht VILIP-1-exprimierender Plattenepithelkarzinomzellen auch Abweichungen in Morphologie und Wachstumsverhalten auf, die jeweils typisch für epitheliale beziehungsweise mesenchymale Zellen sind. Da die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) eine Rolle bei der Tumorinvasion spielt, sollten diese Veränderungen besser charakterisiert werden. Es wurden Expressionsanalysen und Stimulationsexperimente mit Wachstumsfaktoren zur EMT durchgeführt.

### 4.3.1 Profil der Hauttumorzelllinien

Anhand der Aufnahmen der Zelllinien in Kultur, die in Abbildung 4.3.1 A gezeigt sind, ist deutlich erkennbar, dass die VILIP-1-positiven Zellen morphologisch mehr dem Zelltyp von Plattenepithelzellen entsprechen. Die VILIP-1-negativen Zellen dagegen haben eine spindelzellförmige Morphologie mit Fortsätzen, die an mesenchymale Zellen erinnert. Desweiteren wird deutlich, dass CC4B-Zellen im subkonfluenten Stadium Kolonien bilden, CC4A-Zellen jedoch vereinzelt wachsen. Die stärkere Ausbildung von Zell-Zellkontakten war bei VILIP-1-positiven Zellen auch im konfluenten Stadium feststellbar, wie am Beispiel von CH72-Zellen im Vergleich zu CH72T3-Zellen zu sehen ist.



**Abb. 4.3.1.** Charakterisierung VILIP-1-positiver und -negativer Zellen. **A**, Übersicht über die morphologischen Unterschiede und das Wachstumsverhalten der Zelllinien. **B**, Western Blot Analyse,

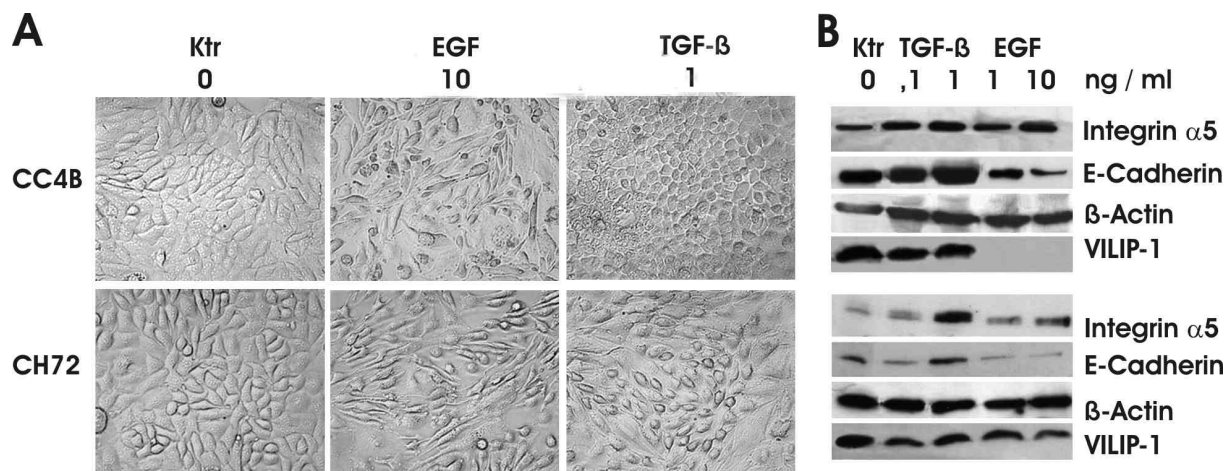
die das Expressionsprofil der SCC-Zellen in Bezug auf E-Cadherin, Integrin  $\alpha 5$  und VILIP-1 wiedergibt (30 $\mu$ g Gesamtprotein pro Probe).  $\beta$ -Aktin wurde als interne Kontrolle verwendet.

Essentieller Bestandteil von Zell-Zell-Kontakten sind membranständige Cadherinproteine (Birchmeier, 1995; Ikeguchi et al., 2000). Es wurde daher untersucht, ob zusätzlich zu dem beschriebenen Unterschied in der Expression von Integrinen (Gonzalez Guerrero et al., 2005) auch für Cadherine eine differenzielle Expression nachgewiesen werden kann. Tatsächlich ergab die Western Blot Analyse, die in Abbildung 4.3.1 B gezeigt ist, dass E-Cadherin, die in Epithelzellen vorherrschende Cadherinvariante, nur in VILIP-1-positiven Zellen exprimiert wird und in VILIP-1-negativen Zellen offenbar verlorengegangen ist. Der in den VILIP-1-negativen Zellen festgestellte Verlust der zelltypspezifischen Morphologie sowie der E-Cadherin-Expression und die damit einhergehende Abnahme an Zell-Zellkontakten gelten als Merkmale der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) (Ahmed et al., 2006; Gavert and Ben-Ze'ev, 2008; Lee et al., 2008).

#### **4.3.2 Auswirkungen der Stimulation mit den Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ und EGF**

Es ist bekannt, dass EMT durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren, wie EGF und TGF- $\beta$  induziert werden kann (Cai et al., 2009; Ellenrieder et al., 2001; Lee et al., 2008; Xu et al., 2009). Es sollte daher überprüft werden, ob sich das Expressionsprofil VILIP-1-positiver Zellen durch Stimulation mit EGF oder TGF- $\beta$ , hinsichtlich der E-Cadherin-Expression, dem der VILIP-1-negativen Zellen angleichen lässt, und ob in diesem Zusammenhang auch die VILIP-1-Expression herunter reguliert wird.

Die Auswirkungen der Wachstumsfaktorstimulation zeigt Abbildung 4.3.2. Die 72stündige Inkubation mit EGF und TGF $\beta$  verursachte in beiden Zelllinien deutliche morphologische Veränderungen. Die Inkubation mit 10 ng/ml EGF führte dazu, dass die Zellform langgestreckter wurde und der Zusammenhalt im Zellverband verloren ging (Abb. 4.3.2 A). Die Inkubation mit 1 ng/ml TGF- $\beta$  bewirkte das Abrunden der Zellen und bei CH72-Zellen auch das Lösen aus dem Zellverband. In der Western Blot Analyse nach Wachstumsfaktorstimulation, wie in Teilabbildung 4.3.2 B gezeigt, war nachweisbar, dass nach EGF-Stimulation konzentrationsabhängig die E-Cadherin-Expression sowie die VILIP-1-Expression abnehmen. Die Proteinexpression von Integrin  $\alpha 5$  dagegen stieg an. Die Stimulation mit TGF- $\beta$  reduzierte ebenfalls leicht das Expressionsniveau von VILIP-1, erhöhte aber die Expression von E-Cadherin und von Integrin  $\alpha 5$ .

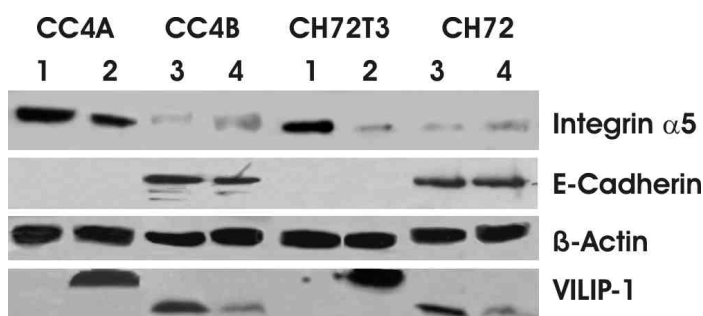


**Abb. 4.3.2**, Auswirkungen der Stimulation mit den Wachstumsfaktoren EGF und TGF- $\beta$  auf VILIP-1-positive Zellen (CC4B: obere Reihe, CH72: untere Reihe). **A**, CC4B- und CH72-Zellen wurden für 72 h mit Wachstumsfaktoren in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und die morphologischen Veränderungen dokumentiert. **B**, Western Blot Analyse, die die Auswirkungen der Wachstumsfaktorstimulation auf das Expressionsniveau von E-Cadherin, Integrin  $\alpha$ 5 und VILIP-1 zeigt.  $\beta$ -Aktin diente als interne Kontrolle.

### 4.3.3 Regulation der Expression von Integrin $\alpha$ 5 und E-Cadherin

Für die Expression von Integrinen wurde bereits ein regulatorischer Effekt von VILIP-1 beschrieben (Gonzalez Guerrico et al., 2005). Um festzustellen, ob VILIP-1 auch die E-Cadherin-Expression beeinflusst, oder ob beide Proteine unabhängig voneinander während EMT herunter reguliert werden, wurde VILIP-1 in VILIP-1-negativen Zellen überexprimiert und in VILIP-1-positiven Zellen supprimiert und anschließend das Expressionsniveau von E-Cadherin und zum Vergleich das von Integrin  $\alpha$ 5 im Western Blot bestimmt.

Aus der in Abbildung 4.3.3 dargestellten Western Blot Analyse kann abgelesen werden, dass sich die VILIP-1-Überexpression abschwächend auf die Expression von Integrin  $\alpha$ 5 auswirkt und sich entsprechend das Expressionsniveau von Integrin  $\alpha$ 5 nach Suppression von VILIP-1 mittels siRNA erhöht. Die E-Cadherin-Expression jedoch wurde weder durch erhöhte VILIP-1-Expression induziert, noch ließ sie sich durch verminderte VILIP-1-Expression, hervorgerufen durch 72stündige Inkubation mit dem siRNA-Cocktail, in VILIP-1-positiven Zellen reduzieren.



**Abb. 4.3.3:** Einfluss der VILIP-1-Expression auf die Expression von E-Cadherin und Integrin  $\alpha 5$ . VILIP-1-negative Zellen wurden entweder mit dem GFP-Kontrollvektor (1) oder dem GFP-VILIP-1-Vektor (2) transfiziert, VILIP-1-positive Zellen entweder mit scr-Kontroll-siRNA (3) oder VILIP-1-spezifischer siRNA (4). Nach 72 h wurden die Zellen lysiert und die Proteinextrakte im Western Blot analysiert (40  $\mu$ g Gesamtprotein pro Probe).

Zusätzlich wurden die Promotorregionen von Integrin  $\alpha 5$  und E-Cadherin sowie zusätzlich von VILIP-1 selber auf das Vorhandensein cAMP-abhängiger regulatorischer Sequenzen überprüft. cAMP-abhängige Genexpression wird häufig über sogenannte CRE-sites (cAMP response element: TGACGTCA) und die daran bindenden Transkriptionsfaktoren CREB, CREM und ATF-1 vermittelt (Sands et al. 2008). Die CREB Target Gene Database (<http://natural.salk.edu/CREB>) wurde eingesetzt, um Bindungsstellen für CRE-bindende Transkriptionsfaktoren in den regulatorischen Sequenzbereichen (-5 kb bis 1 kb relativ zum Transkriptionsstart) der Gene Integrin  $\alpha 5$  (*itga5*), E-Cadherin (*cdh1*), und VILIP-1 (*vsnl1*) der Maus zu identifizieren. Für die allgemeine Suche nach Transkriptionsfaktorbindungsstellen wurden die Programme Signal Scan und Alibaba genutzt (<http://www-bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/signal>, <http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#alibaba2>). Einen Überblick über die Ergebnisse dieser Suche zeigt Tabelle 4.3.3. Die Ausgabe der CRE-Vorhersage für die drei Gene sowie die Ausgaben von Alibaba sind im Anhang zu finden. Für das Integrin  $\alpha 5$ -Gen wurde über die CREB-Target-DB ausschließlich eine halbe CRE-Bindungsstelle ermittelt, ebenso von Signal Scan und keine CREs im von Alibaba untersuchten Sequenzbereich (-600 bis TS). Andererseits identifizierte Alibaba zwei AP-1-, vier AP-2- und eine C/EBP $\alpha$ -Bindungsstelle.

Das E-Cadherin-Gen enthält laut CREB-Target-DB-Vorhersage und der Signal Scan Suche keine CRE-Elemente. Bei den von Alibaba angegebenen potentiellen Bindungsstellen für CREM $\delta$  und CREB (vergleiche Anhang) handelte es sich nur um halbe CREs, denen zusätzlich noch eine Übereinstimmung fehlte. Die Signal Scan Software ermittelte eine AP-1-Bindungsstelle im distalen Sequenzbereich. Alibaba identifizierte im proximalen Sequenzbereich sechs AP-2-, fünf C/EBP $\alpha$ - und zwei C/EBP $\beta$ -Bindungsstellen.

Für das VILIP-1-Gen der Maus gab die CREB-Target-DB 5 halbe (TGACG/CGTCA) Bindungsstellen an, jedoch keine konservierten CR-Elemente oder CRE-Cluster. Es wurde daher keine Regulation über CREs vorhergesagt. Alibaba ermittelte keine und Signal Scan ebenfalls nur halbe CREs. Eine AP-1- und vier AP-2-Bindungsstellen wurden von Signal Scan in den distalen Bereichen identifiziert, keine jedoch in dem von Alibaba untersuchten Bereich 600 bp aufwärts vom TS. In diesem Bereich wurden hingegen vier Bindungsstellen für C/EBP-a gefunden.

Weder Signal Scan noch Alibaba konnten für eines der Gene eine NF-AT-Bindungsstelle ermitteln.

**Tab. 4.3.3.** Übersicht über Bindungsstellen cAMP-aktivierbarer Transkriptionsfaktoren in den regulatorischen Sequenzen der angegebenen Gene. Analytierte Sequenz relativ zum Transkriptionsstart (TS): CREB-Target-DB -5000 bis +1000, Signal Scan -5000 bis TS, Alibaba -600 bis TS. <sup>(1)</sup> nur Ergebnisse von Alibaba, <sup>(2)</sup> unvollständige halbe CREs bei E-Cadherin, eine nicht angegebene CRE (CGTCA) bei -194 bei VILIP-1

	Zugriff ORF	CREB-Target-DB (TGACG / CGTCA)	Alibaba, (Signal Scan)			
			CRE = TGACG / CGTCA	AP-1 = TC/GAC/G TCA	AP-2 = TGGGGA	C/EBP <sup>(1)</sup>
Integrin a5	NM 010577	1 x TGACG / CGTCA	--, (1 x)	2 x, (1 x)	4 x, (7 x)	1 x C/EBP-a
E-Cadherin	NM 009864	--	2 x <sup>(2)</sup> , (--)	1 x, (--)	6 x, (4 x)	5 x C/EBP-a 2 x C/EBP-b
VILIP-1	NM 012038	5 x TGACG / CGTCA	-- <sup>(2)</sup> , (2 x)	--, (1 x)	--, (4 x)	4 x C/EBP-a

#### 4.3.4 Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors snail-1

Es ist bereits umfassend beschrieben worden, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors snail-1 EMT induzieren kann und dass im Zuge dessen eines der Zielgene für seine reprimierende Wirkung das E-Cadherin-Gen ist (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Carver et al., 2001). Snail-1 bindet dazu an E-Box-Motive mit der Consensus-Sequenz CAC/GC/GTG innerhalb der regulatorischen DNA-Regionen eines Genes. Das Vorkommen von drei E-Box-Motiven in der regulatorischen Sequenz des E-Cadherin-Genes der Maus und des Menschen und einer E-Box im Promotorbereich des humanen snail-1-Genes wurden bereits durch andere Studien dokumentiert (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Ikenouchi et al., 2003; Peiro et al., 2006).

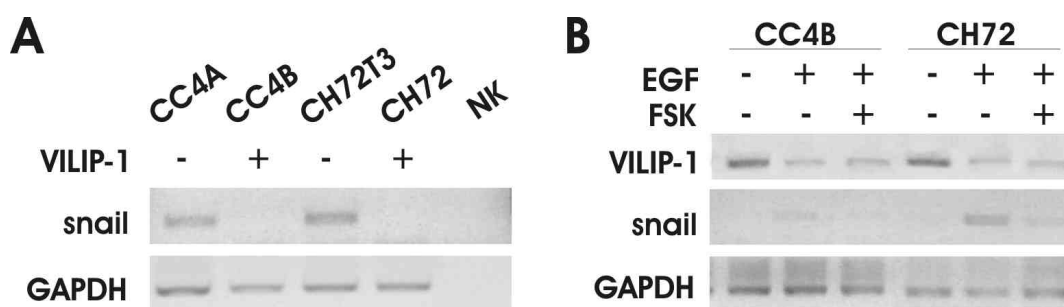
Unter Nutzung der Programme Signal Scan und Alibaba wurde überprüft, ob die Sequenz 3000 bzw. 600 bp aufwärts vom TS des VILIP-1-Gens der Maus E-Box-Motive enthält. Beide Programme gaben keine E-Box-Consensus-Sequenz an. Wie aber mit der AnnHyb-Software (<http://bioinformatics.org/annhyb>) festgestellt wurde, sind drei CAC/GC/GTG-Motive innerhalb von 3 kb aufwärts vom Transkriptionsstart des VILIP-1-Gens vorhanden. Die proximale Konsensussequenz ist in der Ausgabe von Alibaba gekennzeichnet, wurde aber vom Programm selber nicht erkannt (vergleiche Anhang). Ähnlich verhielt es sich bei den bereits bekannten snail-1-Bindungsstellen im E-Cadherin-Promotor. Alibaba identifizierte nur die beiden proximalen E-Box-Motive (E1), nicht aber das dritte, obgleich auch dieses in der Sequenz vorhanden war (vergleiche Markierung im Anhang). Ebenfalls gab Alibaba die nachgewiesene proximale E-Box (E1) im snail-1-Gen der Maus an, nicht aber die zweite Konsensussequenz bei -522. AnnHyb ermittelte weitere sieben E-Box-Konsensussequenzen im Bereich 3 kb aufwärts vom TS des snail-1-Gens. Tabelle 4.3.4.1 zeigt die in Alibaba und AnnHyb ermittelten E-Box-Motive der einzelnen Gene im Überblick.

**Tab. 4.3.4.1,** Übersicht über vorhandenen snail-1-Bindungsstellen innerhalb der regulatorischen Sequenzen der angegebenen Gene, die mit Alibaba bzw. AnnHyb (zusätzliche Bindungsstellen im distalen Sequenzbereich in Klammern) ermittelt wurden. TS = Transkriptionsstart

		VILIP-1	E-Cadherin	snail-1
Gen-Zugriffsnummer		NM 012038	NM 009864	NM 011427
snail-E-Box (CAC/GC/GTG)	Anzahl	1 (3)	3	2 (9)
	Position rel. zum TS	- 568 (-2710, -2907)	-12, -68, -556	-126, -522 (-799, -1310, -1456, -1550, -1816, -1889, -1949)

Als nächstes wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt um experimentell zu überprüfen, ob snail-1 für die gefundenen Expressionsunterschiede von VILIP-1 im Modellsystem ursächlich sein kann. Abbildung 4.3.4.1 A zeigt, dass in den Hauttumorzelllinien, in denen VILIP-1 exprimiert wird, snail-1 nicht nachweisbar war. Eine deutliche snail-1-Expression hingegen war in den Zelllinien vorhanden, die keine VILIP-1-Expression mehr aufwiesen.

Um außerdem zu verifizieren, ob snail-1 in Folge der EGF-Stimulation in den VILIP-1-positiven Zellen exprimiert wird, wurden Gesamt-RNA-Extrakte der Zelllinien CC4B und CH72 nach 72stündiger Inkubation mit dem Wachstumsfaktor dahingehend untersucht. In beiden Zelllinien induzierte EGF die Expression von snail-1 (Abb. 4.3.4.1 B). Durch Zugabe von Forskolin während der letzten 24 Stunden der Inkubationszeit konnte die induzierte snail-1-Expression abgeschwächt werden. Hinsichtlich der VILIP-1-Expression konnte festgestellt werden, dass der durch EGF bewirkten Reduktion nur sehr geringfügig mittels Forskolin entgegengewirkt werden konnte.



**Abb. 4.3.4.1**, Analyse der snail-1-Expression. **A**, Nachweis von snail-1-mRNA in den Tumorzelllinien mittels RT-PCR-Analyse. **B**, Snail-1-Expression in VILIP-1-positiven Zelllinien nach 72-stündiger EGF-Stimulation, Forskolin (FSK) wurde für die letzten 24 h der Inkubation hinzugefügt.

Aufgrund der Beeinflussung der snail-1-Expression durch Forskolin wurde zusätzlich analysiert, ob VILIP-1 über cAMP-abhängige Signalwege möglicherweise die snail-1-Expression moduliert.

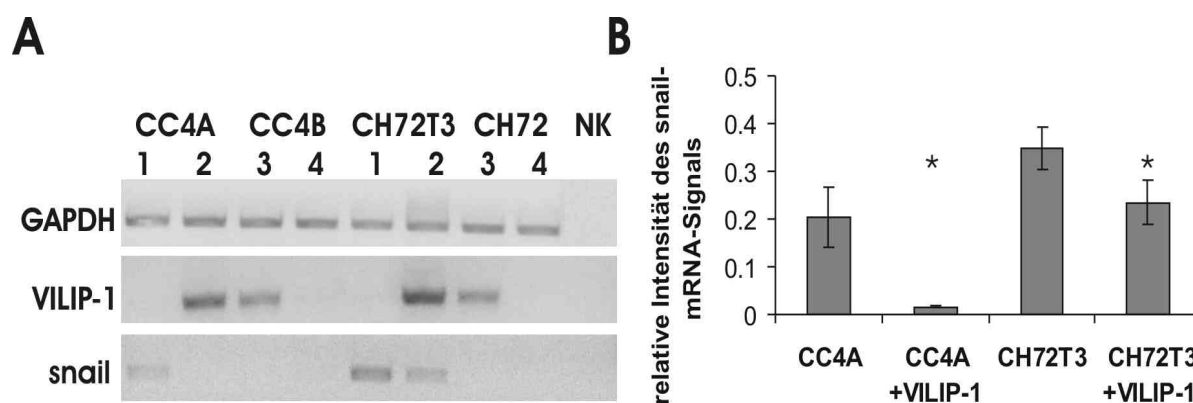
Zunächst wurde auch das snail-1-Gen auf eine mögliche Regulation über CR-Elemente, AP-1-, AP-2-, C/EBP- oder NFAT-Bindungsstellen überprüft. Wie in Tabelle 4.3.4.2 aufgeführt ist, gab die CREB-Target-DB im regulatorischen Sequenzbereich des snail-1-Gens nur eine halbe Bindungsstelle an und stufte demzufolge snail-1 nicht als potentielles CREB-Target ein. Mit Signal Scan konnte in der Sequenz 5 kb aufwärts vom TS eine halbe CRE-Bindungsstelle sowie ein komplettes CR-Element jedoch mit einer falschen Position gefunden werden. In dem von Alibaba untersuchten Sequenzbereich 600 bp aufwärts vom TS wurde kein CRE identifiziert. In diesem Sequenzbereich wurden aber von den Konsensussequenzen der anderen Transkriptionsfaktoren, diejenigen für AP-2 fünfmal und für C/EBP $\alpha$  viermal identifiziert.

**Tab. 4.3.4.2**, Übersicht über Bindungsstellen cAMP-aktivierbarer Transkriptionsfaktoren in den regulatorischen Sequenzen des snail-1-Gens. Analytierte Sequenz relativ zum Transkriptionsstart (TS): CREB-Target-DB -5000 bis +1000, Alibaba -600 bis TS, Signal Scan -5000 bis TS (Ergebnisse in Klammern). <sup>(1)</sup> nur Ergebnisse von Alibaba, <sup>(2)</sup> 1 x TGACATCA und 1 x TGACG

	Zugriff ORF	CREB-Target-DB (TGACG / CGTCA)	Alibaba, (Signal Scan)			
			CRE = TGACG / CGTCA	AP-1 = TGACTCA	AP-2 = TGGGGA	C/EBP <sup>(1)</sup>
snail-1	NM 011427	1 x TGACG	--, (2 x <sup>(2)</sup> )	--, (2 x)	5 x, (3 x)	4 x C/EBP-a



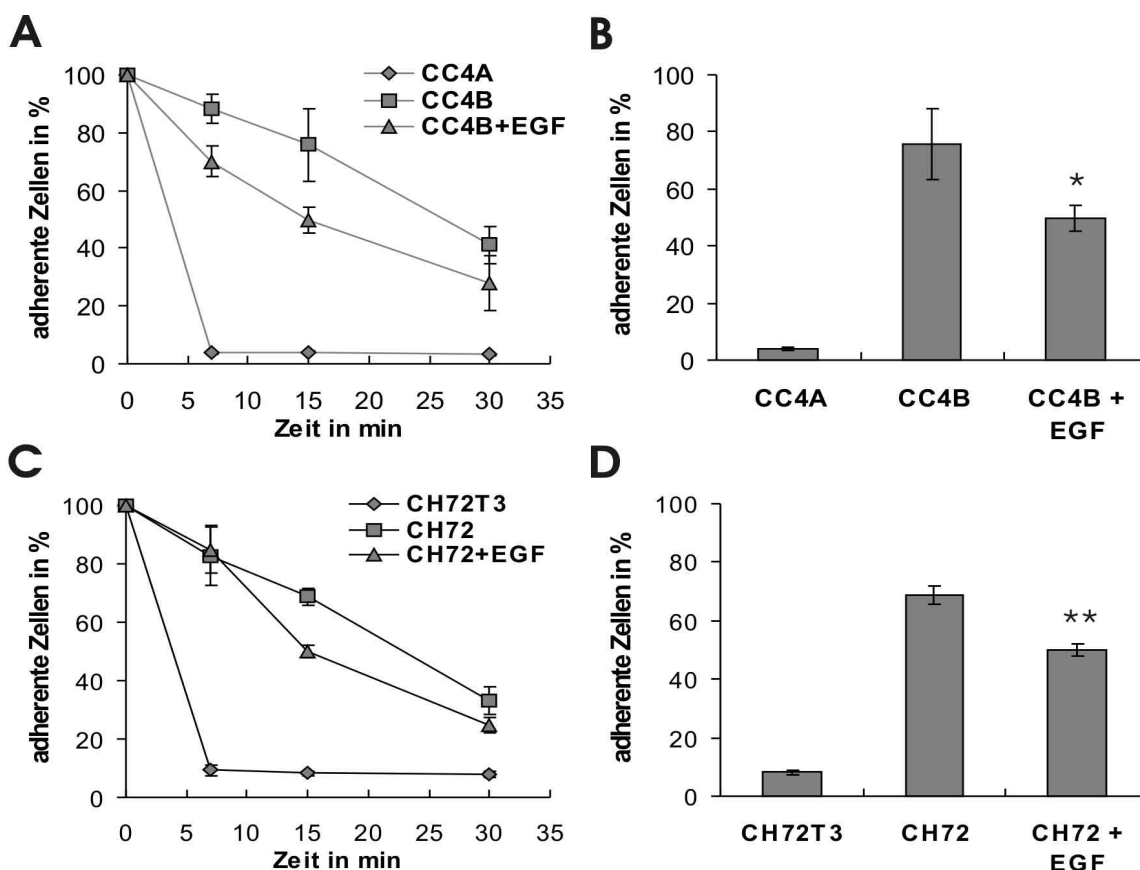
Außerdem wurden in weiteren RT-PCR-Analysen die vorhandenen snail-1-Transkripte in den RNA-Extrakten der Zelllinien nach Transfektion mit GFP-VILIP1 oder VILIP-1-siRNA bzw. den entsprechenden Kontrollen amplifiziert. Abbildung 4.3.4.2 zeigt, dass durch das Einbringen von VILIP-1 in die aggressiven VILIP-1-negativen CC4A- und CH72T3-Zellen die vorhandene snail-1-Expression signifikant reduziert wurde (CC4A:  $p = 0,035$ , CH72T3:  $p = 0,037$ ). Die Transfektion VILIP-1-spezifischer siRNA in die VILIP-1-positiven Zellen führte jedoch nicht zur Induktion der snail-1-Expression.



**Abb. 4.3.4.2**, Einfluss der VILIP-1-Expression auf die Expression von snail-1. **A**, RT-PCR-Analyse der snail-1- und VILIP-1 mRNA-Expression nach 72-stündiger Transfektion mit dem GFP-Kontrollvektor (1), dem GFP-VILIP-1-Vektor (2), der scr-Kontroll-siRNA (3) bzw. der VILIP-1-spezifischen siRNA (4). **B**, Densitometrische Auswertung der snail-1-mRNA-Signalstärke in VILIP-1-negativen Zellen. Die Intensitätswerte wurden mit denen von GAPDH normalisiert. Im Diagramm sind die Mittelwerte von drei Experimenten sowie die Standardabweichung als Fehlerindikatoren gezeigt (CC4A:  $p = 0,035$ , CH72T3:  $p = 0,037$ ).

#### 4.3.5 Dissoziationsverhalten der SCC-Zellen nach EGF-Stimulation

Hinsichtlich der Effekte der EGF-Stimulation sollte ebenfalls überprüft werden, ob dadurch Prozesse der Metastasierung, wie die Zelldissoziation vom Primärtumor oder die Zellmigration ins umliegende Gewebe beeinflusst werden. Zuerst wurden dazu die VILIP-1-exprimierenden SCC-Zellen in Dissoziationsexperimenten untersucht.

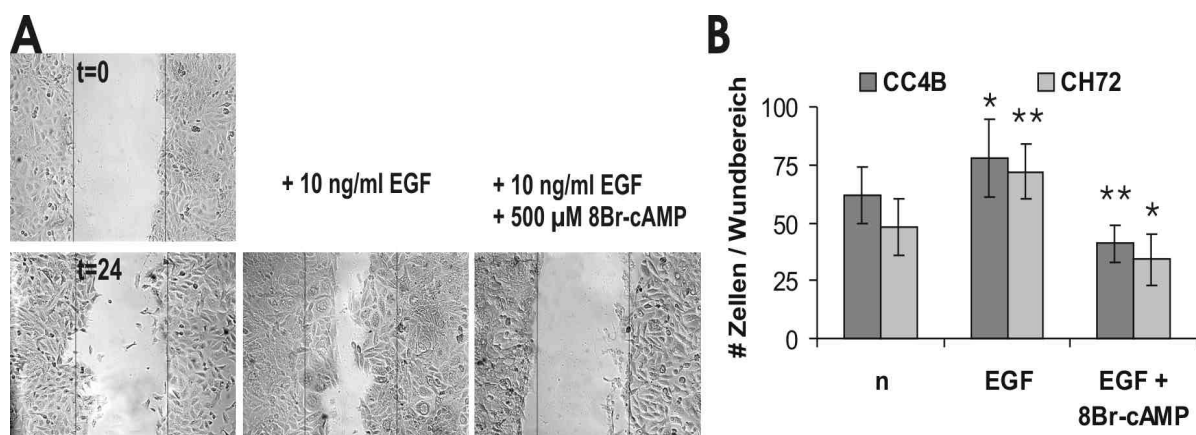


**Abb. 4.3.5,** Dissoziationsverhalten der SCC-Zellen über die Zeit bei Zugabe von EGF. Nach 72-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml EGF wurden die Zellen mittels 0.4% Trypsin/EDTA bei 37°C gelöst und zu verschiedenen Zeiten die Anzahl noch adhärenter Zellen bestimmt. Alle Diagramme zeigen die Mittelwerte aus drei Experimenten und die Standardabweichung als Fehlerindikator. A, C Prozentualer Anteil adhärenter Zellen nach  $t = 7, 15$  und  $30$  min in Bezug auf  $t = 0$  min. B, D Darstellung noch adhärenter Zellen nach 15 min Dissoziation (A, B: CC4A und CC4B,  $p = 0,026$ ; C, D: CH72T3 und CH72,  $p = 0,0016$ ).

In Abbildung 4.3.5 kann abgelesen werden, dass die Zellen eine durch die EGF-Stimulation induzierte beschleunigte Dissoziation aufwiesen. Dies wurde wiederum nach 15 Minuten besonders deutlich. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich 50% der CC4B-Zellen gelöst, im Unterschied zu 25% abgelöster Zellen ohne EGF-Stimulation (Abb. 4.3.5 B). Ebenfalls 50% der stimulierten CH72-Zellen hatten sich nach 15minütiger Inkubation mit Trypsin-EDTA gelöst und damit signifikant mehr als ohne EGF-Stimulation (30%; Abb. 4.3.5 D). Die Beschleunigung der Dissoziation nach Stimulation mit EGF hatte somit etwa das Ausmaß wie nach siRNA-Transfektion. Ein deutlicher Unterschied zum Ablösungsverhalten der VILIP-1-negativen Zellen blieb bei beiden Zelllinien auch nach Wachstumsfaktorstimulation noch erhalten.

### 4.3.6 Auswirkungen der EGF-Stimulation in Migrationsanalysen

*In vitro* Studien zur Migration bei der Wundheilung wurden erneut durchgeführt, um den Einfluss von EGF auf die Zellmigration zu bestimmen. Das Migrationsvermögen der VILIP-1-exprimierenden Zellen nach EGF-Stimulation wurde dabei durch Auszählen der in einen Wundbereich eingewanderten Zellen beurteilt.



**Abb. 4.3.6,** Beeinflussung der Wundheilungs-assoziierten Migration durch Inkubation mit EGF. Es wurden mindestens 8 Wundbereiche aus drei unabhängigen Experimenten ausgezählt und Mittelwerte sowie Standardabweichungen in den Diagrammen dargestellt. **A,** Darstellung repräsentativer Wundbereiche der mit EGF stimulierten, VILIP-1-positiven Zelllinie CC4B 24 h nach dem Setzen der Wunde und der Inkubation mit 8Br-cAMP. Die Linien markieren den Wundbereich zum Zeitpunkt t = 0. **B,** Quantifizierung der Migration VILIP-1-positiver Zellen nach Inkubation mit den angebenen Substanzen (CC4B: EGF p = 0,027, EGF + 8Br-cAMP p = 0,005; CH72: EGF p = 0,003, EGF + 8 Br-cAMP p = 0,045).

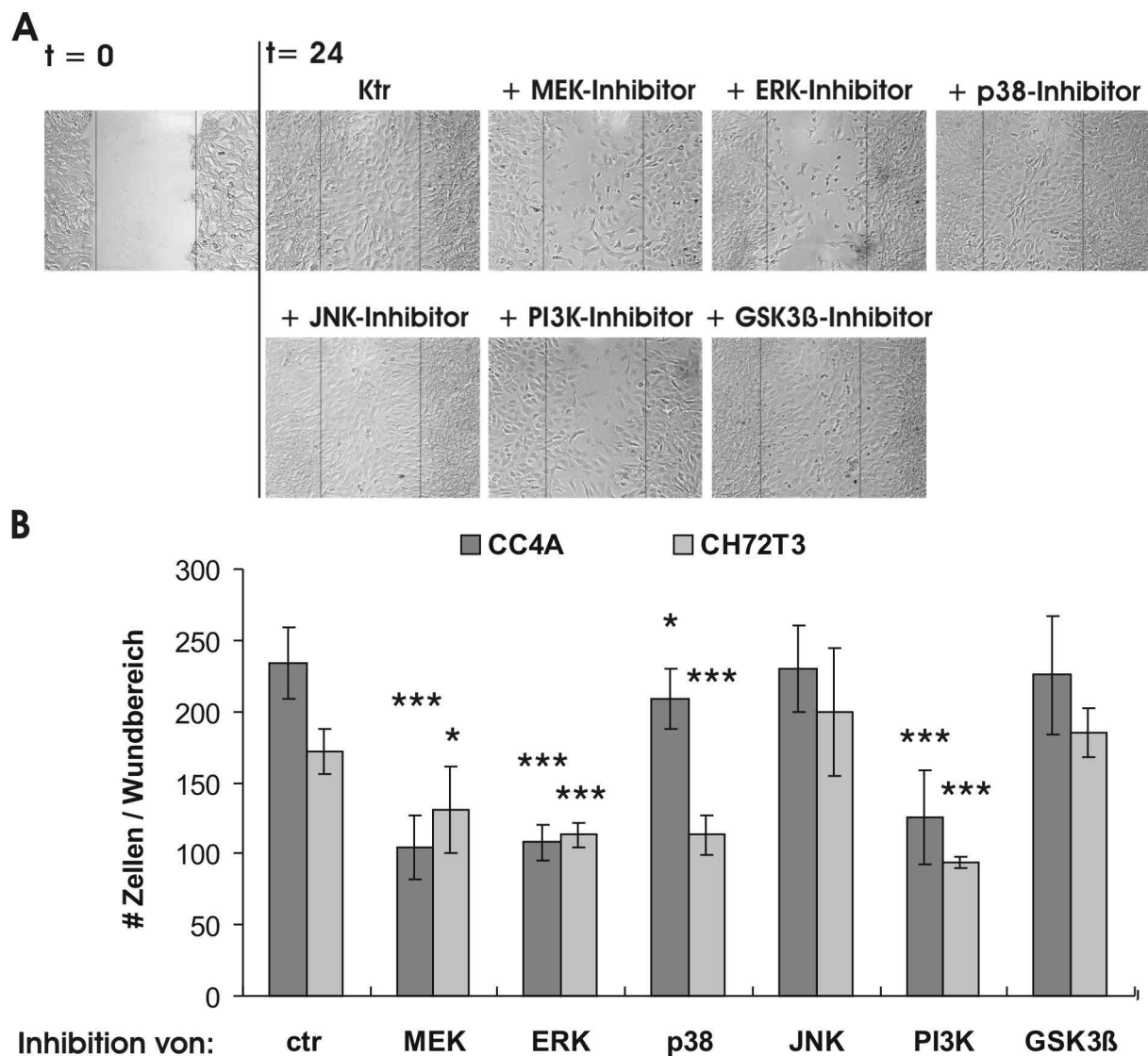
Wie in Abbildung 4.3.6 zu sehen ist, wurde durch 72stündige Präinkubation mit 10 ng/ml EGF das Schließen der gesetzten Wundbereiche forciert. Es konnten signifikant mehr Zellen im Wundbereich vorgefunden werden als beim Kontrollexperiment ohne Stimulation mit dem Wachstumsfaktor. Aufgrund der in vorangegangenen Studien zur Migration bei Wundheilung ermittelten entgegengesetzten Wirkung von cAMP auf das Migrationspotential von Tumorzellen wurde zusätzlich untersucht, ob der Effekt von EGF durch Zugabe von 8Br-cAMP zum Zeitpunkt des Setzens der Wundbereiche aufgehoben oder abgeschwächt werden kann. Diese Versuchsanordnung führte zu weniger migrierenden Zellen im Wundbereich sowohl verglichen mit den Resultaten nach EGF-Stimulation als auch

verglichen mit den Werten des Kontrollexperiments. Demnach konnte 8Br-cAMP den Effekt von EGF aufheben, seine reduzierende Wirkung hinsichtlich der Zellmigration war sogar von größerem Ausmaß als die steigernde Wirkung von EGF.

#### **4.3.7 Beeinflussung des Migrationsverhaltens durch Kinaseinhibitoren**

Die unterschiedlichen Auswirkungen des EGF-Signals auf Proliferation, Differenzierung und Zellmotilität werden über verschiedene, dem EGF-Rezeptor nachgeschaltete Übertragungswege vermittelt (Billadeau, 2007; Estrada et al., 2009; Keely et al., 1997; Viala and Pouyssegur, 2004; Wang et al., 2009). Um unter den möglichen Transduktionskaskaden diejenigen zu bestimmen, deren Inhibition die Zellmigration reduziert, wurden die invasiven VILIP-1-negativen Zelllinien CC4A und CH72T3 in *in vitro* Studien zur Migration bei der Wundheilung mit Inhibitoren verschiedener, über den EGF-Rezeptor aktivierbarer Proteinkinasen inkubiert.

Aus dem EGF-Signaltransduktionsnetzwerk wurden der PI3K- und der GSK3 $\beta$ -Signalweg sowie die MAPK-Kaskaden als Ziele für die Inhibition ausgewählt. Wie in Abbildung 4.3.7 A zu sehen ist, beeinflussten die Inhibitoren von MEK, ERK1/2 und PI3K und p38-MAPK die Motilität der Zellen beider Zelllinien und führten zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von in den Wundbereich eingewanderter Zellen (Abb. 4.3.7 B; CC4A: MEK  $p < 0,0001$ , ERK1/2  $p < 0,0001$ , p38  $p = 0,015$ , PI3K  $p < 0,0001$ ; CH72T3: MEK  $p = 0,02$ , ERK1/2  $p < 0,0001$ , p38  $p < 0,0001$ , PI3K  $p < 0,0001$ ). Die Inkubation mit Inhibitoren von JNK und GSK3 $\beta$  hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Motilität der VILIP-1-negativen Zelllinien CC4A und CH72T3, wobei sich bei CH72T3-Zellen ein beschleunigtes Wiederverschließen der Wundbereiche nach Inhibition von GSK-3 $\beta$  andeutete.



**Abb. 4.3.7:** Wirkung verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Wundheilungs-assoziierte Migration. Es wurden mindestens 8 Wundbereiche aus drei unabhängigen Experimenten ausgezählt und Mittelwerte sowie Standardabweichungen in den Diagrammen dargestellt. **A**, Darstellung repräsentativer Wundbereiche der VILIP-1-negativen Zelllinie CC4A 24 h nach dem Zufügen der Wunde und der Inkubation mit den Inhibitoren (MEK: PD 98059, ERK: ERK activation inhibitor peptide I, p38: SB 202190, JNK: JNK-Inhibitor, PI3K: LY 294002, GSK3 $\beta$ : GSK-3-Inhibitor IX). Die Linien markieren den Wundbereich zum Zeitpunkt t = 0. **B**, Quantifizierung der Migration VILIP-1-negativer Zellen nach Inkubation mit den angebenen Substanzen (CC4A: MEK p < 0,0001, ERK1/2 p < 0,0001, p38 p = 0,015, JNK p = 0,74, PI3K p < 0,0001, GSK3 p = 0,56; CH72T3: MEK p = 0,02, ERK1/2 p < 0,0001, p38 p < 0,0001, JNK p = 0,19, PI3K p < 0,0001, GSK3 p = 0,17).

## 5 Diskussion

Visinin-like-Protein 1 wurde aufgrund des Verlustes der Expression in aggressiven Plattenepithelkarzinomzellen der Haut beziehungsweise der durch seine Expression bewirkten anti-invasiven Effekte als potentieller Tumorinvasionssuppressor identifiziert (Mahloogi et al., 2003). In den Hauttumorzellen konnte außerdem eine reduzierte RhoA- und MMP9-Aktivität, sowie eine verminderte Expression der Integrin-Untereinheiten  $\alpha 5$  und  $\alpha v$  in Abhängigkeit von der VILIP-1-Expression und dem daraus resultierenden erhöhten cAMP-Spiegel nachgewiesen werden (Mahloogi et al., 2003; Gonzalez Guerrico et al., 2005). Bei Ösophagustumoren und nicht-kleinzelligen Lungentumoren ließ sich des Weiteren eine Korrelation zwischen dem Verlust der Expression von VILIP-1 und der Überlebensrate/Prognose zeigen (Fu et al., 2008; Wickborn et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde im Zellkulturmodell aus zwei aggressiven Plattenepithelkarzinom-Zelllinien der Haut ohne VILIP-1-Expression und zwei weniger aggressiven, VILIP-1-exprimierenden Zelllinien untersucht, ob der Einfluss von VILIP-1 auf das Metastasierungspotential der Tumorzellen ausschließlich über cAMP-Signalwege oder auch durch die Modulation der cGMP-Signalgebung durch VILIP-1 vermittelt wird. Darüber hinaus wurde analysiert, welche extrazellulären Signale und welche intrazellulären Signalmoleküle an der Regulation der Expression von VILIP-1 während der Tumorprogression beteiligt sind.

### 5.1 Bedeutung cAMP- und cGMP-abhängiger Signalwege für das Metastasierungspotential von SCC-Zellen

#### 5.1.1 Messung der Konzentration intrazellulärer zyklischer Nukleotide

Um zu beurteilen, inwieweit der Spiegel der zyklischen Nukleotide in Korrelation mit der Aggressivität der Zellen und dem Expressionslevel von VILIP-1 steht, wurde zunächst die intrazelluläre cAMP- und cGMP-Konzentration in vier Plattenepithelkarzinomzelllinien mit unterschiedlicher VILIP-1 Expression und unterschiedlicher Aggressivität gemessen. Die weniger aggressiven VILIP-1-positiven SCC-Zelllinien wiesen einen höheren Gehalt an cAMP auf. Diese Akkumulation von cAMP in VILIP-1 exprimierenden Zellen konnte bereits in  $\beta$ -Zellen des Pankreas und C6-Gliomazellen nachgewiesen werden und bestätigt auch

vorhergehende Messungen in den hier untersuchten Hauttumorzellen (Braunewell and Gundelfinger, 1997; Dai et al., 2006; Mahloogi et al., 2003). In VILIP-1-positiven C6-Gliomazellen wurde zusätzlich ein erhöhter cGMP-Spiegel nach Expression von VILIP-1 festgestellt (Braunewell et al., 2001b). Nach Überexpression von VILIP-1 in hippocampalen und cerebellären Neuronen wurde ebenfalls eine Akkumulation von cGMP ermittelt, die durch natriuretische Peptidrezeptoren (NPR-A, NPR-B) bewirkt wird (Brackmann et al., 2005; Braunewell et al., 2001b). Im Zellkulturmodell der SCC-Zellen dagegen ließ sich der basale cGMP-Spiegel nicht mit dem Expressionslevel von VILIP-1 korrelieren. Nach Zugabe der natriuretischen Peptide ANP und CNP zur Stimulation der partikulären Guanylatzyklasen (NPR-A, NPR-B) wurde in VILIP-1-negativen aggressiven Zellen eine höhere intrazelluläre cGMP-Konzentration gemessen als in VILIP-1-positiven Zellen. Erstaunlicherweise liegt damit in SCC-Zellen eine positive Korrelation des zytoplasmatischen cGMP-Gehalts mit der Aggressivität der Zellen, aber eine negative Korrelation mit der VILIP-1-Expression vor. Ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten cGMP-Spiegel und einem gesteigerten Migrationsvermögen und folglich mit der Aggressivität der Tumorzellen wurde auch bei anderen Krebsarten, wie nicht-kleinzelligen Lungentumoren, Dickdarm-, Nieren- und Brusttumoren gezeigt (Jadeski et al., 2003; Nguyen et al., 2005; Punathil and Katiyar, 2009). Dieser Zusammenhang scheint allerdings unabhängig von VILIP-1 zu sein, da bisher keine reduzierende Wirkung von VILIP-1 auf die intrazelluläre cGMP-Konzentration beschrieben wurde.

### **5.1.2 Zelladhäsion, -dissoziation und -migration in Abhängigkeit vom intrazellulären cAMP- beziehungsweise cGMP-Spiegel**

Mittels Adhäsions-, Dissoziations- und Migrationsstudien sollten in dieser Arbeit der Einfluss eines erhöhten cAMP- beziehungsweise cGMP-Spiegels auf das Metastasierungspotential der aggressiven SCC-Zelllinien CC4A und CH72T3 näher charakterisiert werden.

In diesen Zellen konnte keine Auswirkung einer erhöhten intrazellulären cGMP-Konzentration auf die Fibronectin-vermittelte Adhäsion festgestellt werden. Gleichwohl konnte in anderen Tumorzellen, wie zum Beispiel in Melanozyten eine Reduktion der Zell-Matrixadhäsion auf Fibronectinsubstrat vermittelt durch einen erhöhten cGMP-Spiegel gezeigt werden (Ivanova et al., 2008).

Ebenfalls unbeeinflusst vom cGMP-Spiegel blieb das Dissoziationsverhalten der SCC-Zellen. Die Experimente zeigten aber, dass die aggressiven Zellen trotz höherer Expression der Fibronectin-spezifischen Integrine  $\alpha 5$  und  $\alpha v$  (Gonzalez Guerrico et al., 2005) schneller dissoziieren als die weniger aggressiven Zellen. Damit bestätigte sich die Annahme, dass das Ablösen der Zellen hauptsächlich vom Abbau der interzellulären Verbindungen abhängig ist. Es wurde beschrieben, dass Zell-Zellkontakte epithelialer Zellen die Zugänglichkeit der Zell-Matrixkontakte für Trypsin blockieren können (Simpson et al., 1993). Erst nach dem Auflösen der Cadherinverbindungen durch Trypsin-EDTA, können die Zell-Substratverbindungen enzymatisch gespalten werden. Demnach lassen die Dissoziationsmessungen Rückschlüsse auf den Grad der Verknüpfung zwischen den Zellen zu und es kann geschlussfolgert werden, dass sich der cGMP-Spiegel in den untersuchten Plattenepithelkarzinomzellen weder auf die Regulation von Zell-Matrix- noch von Zell-Zellkontakten auswirkt.

Studien zur Tumorzellmigration zeigten, dass eine Zunahme an intrazellulärem cGMP induziert durch den Botenstoff Stickstoff (NO) das Migrationsvermögen über die Aktivierung von ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2) fördert (Jadeski et al., 2003; Punathil and Katiyar, 2009). In Übereinstimmung damit führte die Erhöhung der cGMP-Konzentration in den aggressiven SCC-Zellen zu einer deutlichen Steigerung der bereits erhöhten Motilität. Sowohl die Stimulation mit ANP, als auch der Einsatz des PDE-resistenten 8Br-cGMP beschleunigten die Migration der SCC-Zellen in den Wundbereich und dadurch das Schließen der in die Einzelzellschicht gesetzten Wunden. Einen Hinweis darauf, dass auch in SCC-Zellen der cGMP-Effekt möglicherweise über ERK1/2 vermittelt wird, geben weitere durchgeführte *in vitro* Migrationsanalysen, in denen der zugesetzte ERK1/2-Inhibitor ERK activation inhibitor peptide 1 als Suppressor der Migration wirkte (vergl. Abschnitte 4.3.7 und 5.2.6).

Ein Einfluss von cAMP sowohl auf die Zell-Matrixadhäsion als auch auf die Zellmigration wurde bei einer Vielzahl von Zelltypen beschrieben. Hierbei spielt die Aktivierung der GTPase Rap1 über Epac und die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA eine wichtige Rolle. Rap1 kann nicht nur durch die Modulation der Integrinaktivität die punktuelle Zell-Matrixadhäsion steuern, sondern außerdem Zell-Zellverbindungen stabilisieren und über diese beiden Mechanismen der Invasivität von Tumorzellen entgegenwirken (Kooistra et al., 2005; Lyle et al., 2008; Melnikova and Bar-Eli, 2008). PKA beeinflusst Adhäsion und Migration vor allem durch die Modulation des Aktinzytoskeletts (Howe, 2004; Parmo-Cabanas et al., 2004) und durch die Kontrolle der Expression von Integrinuntereinheiten (Gonzalez Guerrico et al., 2005). In den durchgeführten Adhäsionstests mit SCC-Zellen wurde in Kongruenz mit



vorherigen Analysen in diesem Modellsystem eine Reduktion der Adhäsion auf Fibronektinsubstrat nach Stimulation mit Forskolin festgestellt (Gonzalez Guerrico et al., 2005). Dieser Effekt ließ sich in der vorliegenden Arbeit zusätzlich durch Zugabe des PDE-resistenten 8Br-cAMP hervorrufen.

Auf die Migration der Plattenepithelkarzinomzellen hatte die Erhöhung des cAMP-Spiegels ebenfalls beträchtliche Auswirkungen. Sowohl Forskolin als auch 8Br-cAMP inhibierten das Schließen der in die Einzelzellschicht gesetzten Wunden durch Abschwächung der Zellmigration. Wie andere Studien zur Analyse der Migration zeigten, wird die bei migrierenden Zellen auftretende Bildung von Stressfasern und das Austrecken der Zellen in Wundbereiche durch die Aktivität von PKA und die resultierende Inhibition von RhoA verhindert (Campos et al., 2009; Fernandez-Sauze et al., 2009; Kikuchi et al., 1997). In vorangehenden Untersuchungen im hier verwendeten Modellsystem wurde passend dazu in den weniger aggressiven SCC-Zellen mit erhöhtem cAMP-Spiegel eine verringerte RhoA-Aktivität gezeigt (Mahloogi et al., 2003). Die Annahme, dass PKA die Migrationsfähigkeit von SCC-Zellen entscheidend mitbestimmt, wird außerdem durch die Resultate der durchgeführten Wundheilungs-/Migrationsexperimente bekräftigt, die zeigten, dass die Anzahl migrierender Zellen nach Zugabe des PKA-Inhibitors H89 zunimmt. Demzufolge werden die durch cAMP vermittelten Effekte auf Zelladhäsion und Zellmigration zumindest anteilig durch PKA umgesetzt, zum einen durch die Inhibition von RhoA, zum anderen durch die Inhibition der Expression der Fibronektin-spezifischen Integrinuntereinheiten  $\alpha 5$  und  $\alpha v$  (Gonzalez Guerrico et al., 2005). Vermutlich kommen aber zusätzlich Epac-Rap1-vermittelte Effekte auf die Integrinaktivität und die Stabilität von Zell-Zellkontakten zum Tragen (Howe, 2004; Lyle et al., 2008; Kooistra et al., 2005).

Wie die Erhöhung des cGMP-Spiegels hatte die Inkubation mit Forskolin oder 8Br-cAMP keinerlei Auswirkungen auf das Dissoziationsverhalten der aggressiven Hauttumorzellen. Während in Endothelzellen eine Zunahme von VE-Cadherin-Kontakten und ihre Stabilisierung durch die Aktivierung von Epac-1 induziert werden konnte (Kooistra et al., 2005), wurde die Ausbildung von Zell-Zellkontakten in den aggressiven SCC-Zellen durch eine erhöhte cAMP-Konzentration nicht derart verstärkt, dass infolge dessen die Zellen schwerer dissoziierbar gewesen wären.

Aus den funktionellen Untersuchungen zur Rolle der zyklischen Nukleotide lässt sich zusammenfassend für SCC-Zellen ableiten, dass eine cGMP-Akkumulation die Migration und folglich die Aggressivität der Plattenepithelkarzinomzellen verstärkt, wohingegen ein erhöhter cAMP-Gehalt sowohl die Zell-Matrixadhäsion, als auch die Migration und damit das

Invasionspotential reduziert. Tatsächlich konnte in Bezug auf die Migration in Brusttumorzellen aus der Maus dasselbe Phänomen gezeigt werden. Hier inhibierte cAMP die Migration und die Ausbildung von Lamellipodien, wohingegen cGMP beides verstärkte (Chen et al., 2008).

### 5.1.3 Zelldissoziation und -migration in Abhängigkeit von VILIP-1

Als nächstes wurde überprüft, welche Auswirkungen die VILIP-1-Expression auf die analysierten Teilaspekte der Tumordinvasion hat und ob diese mit den Effekten der zyklischen Nukleotide korrelieren. Der Effekt von VILIP-1 auf die Fibronectin-vermittelte Zell-Matrixadhäsion wurde bereits ausführlich beschrieben (Gonzalez Guerrico et al., 2005).

In Dissoziationsmessungen wurde durch Überexpression von VILIP-1 in den aggressiven Zelllinien CC4A und CH72T3 keine Veränderung beim Lösen der Zellen erreicht. Erstaunlicherweise beschleunigte die Herunterregulation von VILIP-1 in den weniger aggressiven, VILIP-positiven Zellen ihre Dissoziation, obwohl weder die Modulation der zyklischen Nukleotide noch die Überexpression von VILIP-1 einen Einfluss auf das Dissoziationsverhalten der aggressiven VILIP-1-negativen Zellen hatten. Aufgrund der Morphologie und des Dissoziationsverhaltens der VILIP-1-positiven Zellen im Vergleich zu den VILIP-1-negativen Zellen war zu erwarten, dass diese mehr Zell-Zellkontakte aufweisen. Diese Vermutung wurde bestätigt durch die Bestimmung des E-Cadherin-Expressionsniveaus (vergl. Abschnitt 4.3.1). Da durch die Transfektion der VILIP-1-spezifischen siRNA nur eine leichte Beschleunigung der Dissoziation bewirkt wurde, und in den späteren Untersuchungen zur Regulation der E-Cadherin-Expression kein kausaler Zusammenhang zur VILIP-1-Expression nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass der beobachtete Effekt eher über die Regulation der Integrine vermittelt wird. Als Folge einer erhöhten Integrin-Expression werden Cadherinkomplexe destabilisiert und internalisiert (Geiger et al., 2001; Gimond et al., 1999; von et al., 2000). Durch weitere Dissoziationsmessung mit den VILIP-1-positiven Zelllinien unter Inhibition von PKA, um die Integrinexpression zu reduzieren oder Integrin-unabhängigen Aggregationsmessungen könnte diese Annahme verifiziert werden.

Die Modulation der VILIP-1-Expression in den durchgeführten Wundheilungs-/Migrationsanalysen ergab, dass VILIP-1 als Inhibitor der Tumorzellmigration wirkt und damit den gleichen Effekt hat, wie die Erhöhung des cAMP-Spiegels. Durch die Blockierung der

cAMP-Produktion durch den Adenylatzyklaseinhibitor DDA parallel zur Überexpression von VILIP-1 konnte nachgewiesen werden, dass der migrationsreduzierende Effekt von VILIP-1 direkt über cAMP-abhängige Signalwege vermittelt wird. cAMP gesteuerte Prozesse, wie die Expression bestimmter Integrinuntereinheiten und die Modulation der Aktivität von RhoA, bedingen allerdings nur einen Teil des Unterschieds im Migrationsverhalten der aggressiven und weniger aggressiven SCC-Zellen, wie durch die bleibende Differenz in der Anzahl migrierender Zellen sowohl nach VILIP-1-Überexpression in invasiven SCC-Zellen im Vergleich zu den weniger invasiven Zellen als auch nach VILIP-1-Supprimierung in den weniger invasiven SCC-Zellen verglichen mit den invasiven Zellen deutlich wird. Ebenso könnten Unterschiede in der Aktivität des PI3K-Signalweges oder aber der MAPK-Kaskaden, über welche ebenfalls die Migration reguliert werden kann (Ahmed et al., 2006) (Ellerbroek et al., 2003), bei VILIP-1-positiven und VILIP-1-negativen Zellen die festgestellten Abweichungen im Migrationsverhalten bedingen.

Die Experimente unter Modulation der VILIP-1-Expression belegen folglich, dass der Effekt von VILIP-1 auf Zell-Matrixadhäsion und Zellmigration der SCC-Zellen über cAMP-abhängige Signalwege vermittelt wird, die Dissoziation vermutlich nur indirekt von VILIP-1 beeinflusst wird.

#### **5.1.4 Expression der partikulären Guanylatzyklasen**

Weitere Experimente sollten letztendlich klären, ob der nach Stimulation erhöhte cGMP-Gehalt in SCC-Zellen direkt durch VILIP-1 bedingt wird oder unabhängig davon in den aggressiven Tumorzellen ansteigt. Mittels RT-PCR-Analysen zur spezifischen Bestimmung der Expressionsstärke der partikulären Guanylatzyklasen auf mRNA-Ebene unter Regulation der VILIP-1-Expression war nachweisbar, dass dem gemessenen erhöhten cGMP-Spiegel in den aggressiven VILIP-1-negativen Zelllinien eine höhere Expression von NPR-A und NPR-B zu Grunde liegt, die aber nicht durch VILIP-1 hervorgerufen wird. Der in hippocampalen Neuronen und PC-12-Zellen beschriebene verstärkende Effekt von VILIP-1 auf die Oberflächenexpression von Guanylatzyklasen und damit auf den cGMP-Spiegel (Brackmann et al., 2005; Braunewell et al., 2001b) kommt in diesen Zellen nicht zum Tragen, da die VILIP-1-positiven Tumorzellen die Guanylatzyklasen wesentlich schwächer exprimieren als die VILIP-1-negativen Tumorzellen. In SCC-Zellen steht ein erhöhter cGMP-Spiegel demnach unabhängig von der VILIP-1-Expression in Zusammenhang mit ihrer

Aggressivität, wohingegen ein erhöhter cAMP-Spiegel aus der Expression von VILIP-1 resultiert und die verminderte Aggressivität bedingt.

### **5.1.5 Expression und Lokalisierung der Adenylatzyklase-Isoformen**

Wie VILIP-1 die verstärkte Akkumulation von cAMP bewirkt ist noch unbekannt. Ein Einfluss auf die Aktivität einer der Adenylatzyklase-Isoformen durch direkte Interaktion konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Braunewell and Klein-Szanto, 2009). Eine andere Möglichkeit wäre auch bei den Adenylatzyklasen ein ungleiches Expressionsniveau bestimmter Isoformen in den SCC-Zelllinien mit verschiedenem Invasionspotential. Für einen spezifischen Nachweis der mRNA-Expression der zehn Adenylatzyklase-Isoformen in den untersuchten Plattenepithelkarzinomzellen wurde nach selektiver Extraktion der Gesamt-RNA, das mittels oligo-dT-Primern zu cDNA umgeschriebene Transkriptom mit Isoform-spezifischen Primer amplifiziert. Das RT-PCR-Screening zeigte, dass die Isoformen 3, 5, 6, 7 und 9 exprimiert werden. Ein Effekt von VILIP-1 auf die Expression der Adenylatzyklasen konnte ausgeschlossen werden, da keine der Isoformen in VILIP-1-positiven Zellen ein signifikant verschiedenes Expressionsniveau zu dem in VILIP-1-negativen Zellen aufwies.

Die Oberflächenexpression der Adenylatzyklasen ist maßgeblich für die Aktivität der Enzyme und kann neben der Genexpression ebenfalls ursächlich für einen erhöhten cAMP-Spiegel sein (Hanoune and Defer, 2001). Für die intrazelluläre Lokalisation der Adenylatzyklasen wurde ein Primärantikörper gewählt, der gegen ein konserviertes zytoplasmatisches Epitop von Adenylatzyklasen gerichtet ist. Dies war von Vorteil, da jede der im RT-PCR-Screening nachgewiesenen AC-Isoformen für eine Interaktion mit VILIP-1 beziehungsweise für die Generierung der erhöhten cAMP-Konzentration in VILIP-1-positiven Zellen in Frage kommt. Derartige AC-Antikörper wurden bereits im Western Blot zum Nachweis von Adenylatzyklasen eingesetzt und zeigten darüber hinaus gleichmäßige Immunreaktivität im Zellsoma und punktförmige an der Zellmembran von Neuronen (Jacobowitz and Iyengar, 1994; Mons and Cooper, 1994). Die durchgeführten Intensitätsmessungen der AC-spezifischen Immunreaktivität in den SCC-Zellen zeigten, dass in den VILIP-1-positiven, weniger aggressiven Zellen das AC-Signal über der Membran wesentlich stärker ist als in den VILIP-1-negativen aggressiven Zellen, was darauf hindeutet, dass der erhöhte basale cAMP-Spiegel in der verstärkten Oberflächenexpression der Adenylatzyklasen begründet ist. Anscheinend wirkt sich VILIP-1 auch auf die Oberflächenexpression von Adenylatzyklasen

aus, wie es bereits für Guanylatzyklase B (NPR-B), den nikotinischen  $\alpha 4\beta 2$  Acetylcholinrezeptor, den P2X2-Rezeptor und den Transferrin-Rezeptor gezeigt wurde (Brackmann et al., 2005; Chaumont et al., 2008; Lin et al., 2002b; Zhao et al., 2009).

Aufgrund des eingesetzten AC-Antikörpers gegen alle Isoformen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Oberflächenexpression von Adenylatzyklasen generell durch VILIP-1 beeinflusst wird oder ob es sich um einen Isoform-spezifischen Effekt handelt. Um gegebenenfalls eine bestimmte Isoform zu identifizieren beziehungsweise um den Kreis der in Frage kommenden Isoformen einzuschränken, wurden AC-Expressionsmuster zum Vergleich herangezogen, die im Rahmen anderer Studien ermittelt wurden. Bei C6-Gliomazellen und hippocampalen Neuronen, welche ebenfalls eine von der VILIP-1-Expression abhängige cAMP-Akkumulation zeigen (Braunewell and Gundelfinger, 1997; Schönraht et al., in Vorbereitung), sowie bei PC12-Zellen, die diesen Effekt nicht aufweisen (Braunewell et al., 2001b), wurden ebenfalls alle exprimierten AC-Isoformen identifiziert. Bezieht man das Expressionsmuster der Adenylatzyklase-Isoformen in den Zelltypen mit cAMP-Akkumulation mit ein, ergeben sich die Isoformen 3, 6 und 9 als mögliche Ziele für eine Beeinflussung durch VILIP-1. AC9 wird ubiquitär exprimiert und kann als einzige membranständige Isoform nicht durch Forskolin aktiviert werden (Hanoune and Defer, 2001; Yan et al., 1998). Da die Stimulation mit Forskolin ähnliche Auswirkungen in aggressiven SCC-Zellen hat, wie die Transfektion von VILIP-1 (Mahloogi et al., 2003), ist es unwahrscheinlich, dass die anti-invasiven Effekte von VILIP-1 über AC9 vermittelt werden. Die Aktivität von Adenylatzyklasen an der Zelloberfläche wird Isoform-spezifisch durch  $Ca^{2+}$ , eine Vielzahl von GProteinen und Proteinkinasen moduliert (Hanoune and Defer, 2001). Interessanterweise gehören AC3 und AC6 zu den durch  $Ca^{2+}$  regulierten Isoformen (Hanoune and Defer, 2001). Die Exozytose von AC6 erfolgt ferner über Protein-Proteininteraktion innerhalb der zytoplasmatischen Domänen C1 und C2 gerichtet in bestimmte Mikrodomänen der Membran, sogenannte lipid rafts. Diese Mikrodomänen wurden basierend auf der  $Ca^{2+}$ -gebundenen Tertiärstruktur von VILIP-1 als Bereiche verstärkter Interaktion von VILIP-1 mit Membranlipiden vorhergesagt (Ohya and Horowitz, 2002) (unveröffentlichte Daten, Diplomarbeit Kristian Lange). Weitere Experimente, beispielsweise mit einzelnen fluoreszenzmarkierten Adenylatzyklase-Isoformen sind nötig, um den genauen Mechanismus einer möglichen Isoform-spezifischen Interaktion aufzuklären, wie es zuvor für GC-B und den nikotinischen  $\alpha 4\beta 2$  AChR gelungen ist.

Allerdings wurden AC3 und AC6 auch in den analysierten PC12-Zellen nachgewiesen. Eine cAMP-Akkumulation bei Überexpression von VILIP-1 konnte aber in früheren Versuchen mit PC-12-Zellen nicht festgestellt werden (Spilker et al., 1997). Zum einen muss dabei beachtet

werden, dass verschiedene Klone von PC-12-Zelllinien existieren, die hinsichtlich ihres Phänotyps und ihres Transkriptoms sehr inhomogen sein können, so dass die cAMP-Messungen in den für die RT-PCR-Analysen eingesetzten PC-12-Zellen zur Verifizierung des Effekts von VILIP-1 auf den cAMP-Spiegel speziell in diesen Zellen ergänzt werden müssten. Zum anderen muss ebenso in Betracht gezogen werden, dass der Effekt von VILIP-1 unabhängig von einer speziellen Adenylatzyklase-Isoform ist und stattdessen zelltypspezifisch über zwischengeschaltete Moleküle vermittelt werden könnte, die beispielsweise eine Rolle beim Transport oder Recycling von Oberflächenrezeptoren spielen. Kolokalisationen von VILIP-1 mit Modulatoren von Membrantransportprozessen, wie Aktin, Clathrin und Syntaxin 6, wurden in Neuronen bereits beschrieben (Spilker et al., 2002a) (Brackmann et al., 2005; Zhao et al., 2009) und stellen somit mögliche Ausgangspunkte für den durch VILIP-1 vermittelten Effekt auf die Oberflächenexpression von Membranrezeptoren und folglich auch von Adenylatzyklasen dar.

### 5.1.6 Fazit

Zusammenfassend können aus dem ersten Satz an Experimenten zur Analyse der Bedeutung der zyklischen Nukleotide für das Invasionspotential von Plattenepithelkarzinomzellen der Haut und ihres Beitrags zu den anti-invasiven VILIP-1-vermittelten Effekten die folgenden, in Abb. 5.1.6 dargestellten Schlussfolgerungen gezogen werden:

- 1) Eine Akkumulation von cGMP verstärkt die Migration und folglich die Aggressivität der Plattenepithelkarzinomzellen, wohingegen ein erhöhter cAMP-Gehalt sowohl die Zell-Matrixadhäsion, als auch die Migration reduziert.
- 2) Aggressive, VILIP-1-negative SCC-Zellen weisen nach Stimulation partikulärer Guanylatzyklasen einen erhöhten cGMP-Spiegel auf, der auf ein höheres, aber von VILIP-1 unabhängiges Expressionsniveau von NPR-A und NPR-B zurückgeführt werden kann.
- 3) Der erhöhte basale cAMP-Spiegel in den weniger aggressiven, VILIP-1-positiven SCC-Zellen wird direkt durch die Expression von VILIP-1 bedingt, basiert jedoch nicht auf einem Einfluss des NCS-Proteins auf das Expressionsniveau einer Adenylatzyklase-Isoform, sondern auf einer verstärkten Oberflächenexpression von Adenylatzyklasen.

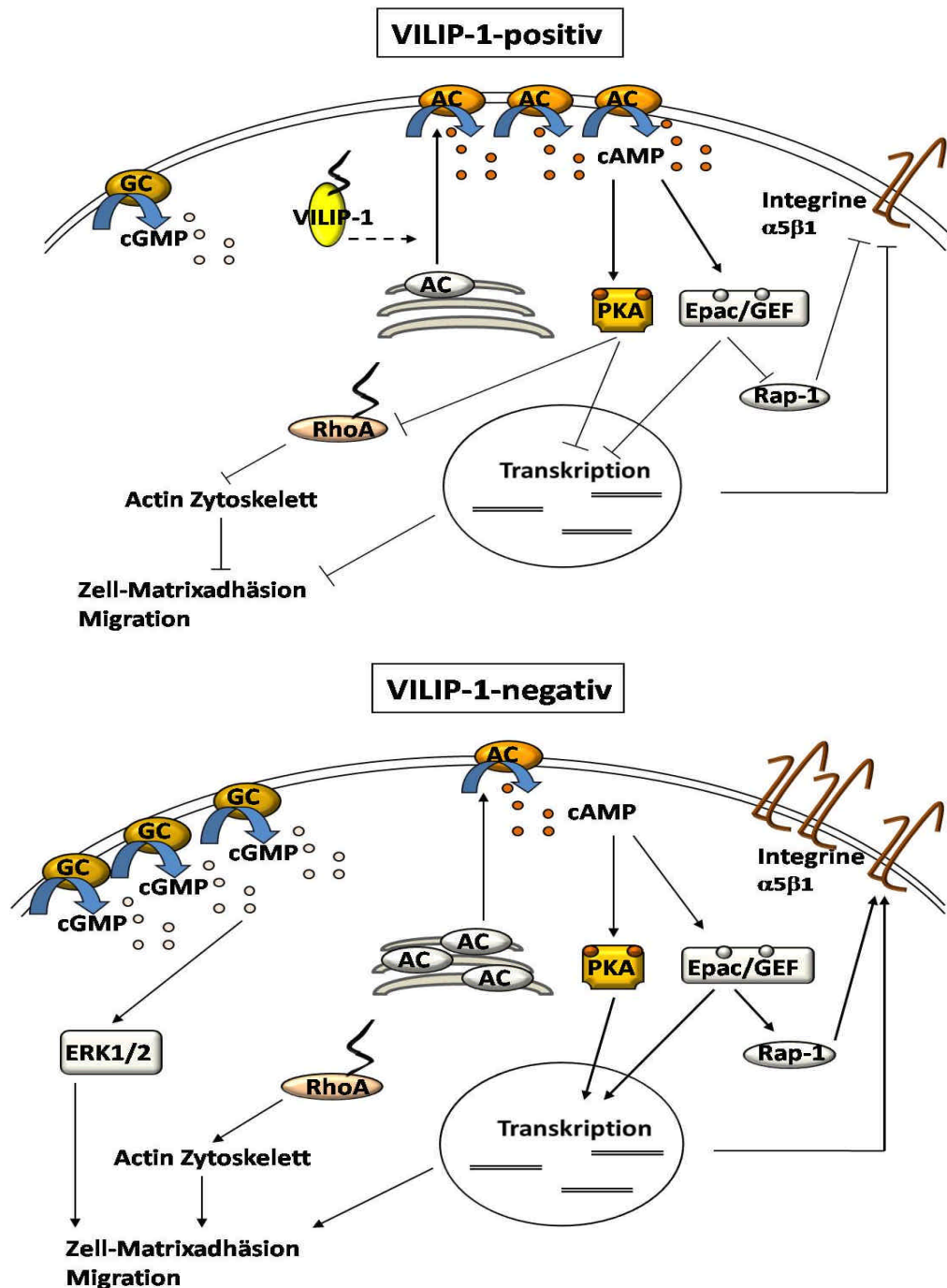


Abb. 5.1.6: In SCC-Zellen ermittelte, mit VILIP-assoziierte Zusammenhänge. (in Farbe: in diesem Modellsystem bereits nachgewiesene Effekte, grau: ergänzende Zusammenhänge aus Literaturangaben, -> positiver Einfluss auf Aktivität oder Expression --| negativer Einfluss). VILIP-1-exprimierende Zellen weisen eine erhöhte Adenylatzyklase(AC)-Oberflächenexpression auf und dadurch einen erhöhten cAMP-Spiegel. Die cAMP-abhängige Inhibition der RhoA-Aktivität und der Expression von Integrin  $\alpha 5\beta 1$  reduziert das Invasionspotential. Zusätzlich wäre ein inhibierender Einfluss von Epac-Rap1 auf die Integrinexpression und -aktivität möglich. In VILIP-1-negativen, aggressiven Zellen liegt eine von VILIP-1 unabhängige, verstärkte Guanylatzyklase-Expression vor. Ein erhöhter cGMP-Spiegel nach Stimulation der Enzyme verstärkt, möglicherweise über ERK1/2, das Migrationsvermögen. Der Verlust der VILIP-1-Expression reduziert in diesen Zellen den cAMP-Spiegel und trägt so Integrin-vermittelt zu gesteigerter Zell-Matrixadhäsion und Zellmigration bei.

Damit wird deutlich, dass die durch die Expression von VILIP-1 bewirkte Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels der entscheidende Effekt für die Reduktion des Metastasierungspotentials der Plattenepithelkarzinomzellen ist. Sowohl die Reaktivierung der VILIP-1-Expression, als auch die Erhöhung der cAMP-Konzentration stellen folglich mögliche Ansatzpunkte für anti-invasive Therapien bei aggressiven SCC-Zellen der Haut dar. Außerdem bestärkt der Einfluss von VILIP-1 auf die Lokalisierung von Adenylatzyklasten in der Zellmembran die Hypothese, dass eine wichtige Funktion des NCS-Proteins die Modulation der Oberflächenexpression verschiedener Rezeptoren ist, die bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine Rolle spielen.



## 5.2 Untersuchungen zur Rolle von VILIP-1 bei der Tumorprogression

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Modulatoren der Expression von VILIP-1 im Hauttumorzellmodell zu ermitteln und speziell extrazelluläre Signale zu identifizieren, die VILIP-1 im Prozess der Tumorprogression ausschalten. Es wurden daher weitere Experimente durchgeführt, um die Unterschiede der VILIP-1-positiven und VILIP-1-negativen SCC-Zellen besser erklären zu können, und um die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Aggressivität und die Expression von VILIP-1 zu bestimmen.

### 5.2.1 Profil der Hauttumorzelllinien

Deutlich erkennbare Abweichungen in Morphologie und Wachstumsverhalten zwischen den aggressiven und weniger aggressiven Zelllinien ließen auf eine unterschiedlich starke Ausbildung von Zell-Zellkontakten schließen. Das vorherrschende Adhäsionsmolekül zur Formierung von Zell-Zellkontakten ist bei epithelialen Zellen E-Cadherin. Mögliche Unterschiede im Expressionsniveau dieses Adhäsionsmoleküls sollten mittels Western Blot Analysen festgestellt werden. Der eingesetzte Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop von E-Cadherin wurde bereits vorher zum spezifischen Nachweis des Adhäsionsmoleküls in Western Blot Analysen eingesetzt (Huber et al., 1999;Kasper et al., 1995).

Dem Expressionsprofil der vier Zelllinien, welches die Proteinexpression von VILIP-1, Integrin  $\alpha 5$  und E-Cadherin gegenüberstellt, war zu entnehmen, dass die E-Cadherin-Expression in den VILIP-1-negativen Zellen gänzlich verloren gegangen ist, wodurch die Ausbildung der typischen E-Cadherin-abhängigen interzellulären Verbindungen unterbunden wird, während Integrin  $\alpha 5$  stark exprimiert wurde. In den VILIP-1-positiven Zellen hingegen ließ sich die Expression von E-Cadherin deutlich nachweisen und eine schwächere Expression der Integrinuntereinheit  $\alpha 5$  bestätigen. Dieser Wandel in der Expression der Adhäsionsmoleküle zusammen mit dem Verlust der zelltypspezifischen Morphologie und der Auflösung des Zellverbands ist bezeichnend für die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (Ahmed et al., 2006;Gavert and Ben-Ze'ev, 2008;Lee et al., 2008).

## 5.2.2 Stimulation mit den Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ und EGF

Die Feststellung, dass die VILIP-1-positiven Zellen im Unterschied zu den VILIP-1-negativen Zellen den EMT-Prozess noch nicht vollzogen haben, lässt zwei Hypothesen zu. Entweder ist der Verlust von VILIP-1 ein Auslöser für EMT, oder die VILIP-1-Expression geht im Zuge dieses Prozesses verloren. Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurde zunächst der Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF und TGF $\beta$ , die als potente Induktoren von EMT gelten (Cai et al., 2009; Ellenrieder et al., 2001; Lee et al., 2008; Xu et al., 2009), auf die Expression von VILIP-1, E-Cadherin und Integrin  $\alpha 5$  der VILIP-1-positiven Zellen bestimmt. Tatsächlich resultierte die chronische Stimulation mit EGF in einer abgeschwächten Expression von E-Cadherin und VILIP-1, in einer leicht erhöhten Expression von Integrin  $\alpha 5$  und in einem aufgelösten Zellverband mit langgestreckten Zellen. Vergleichbares wurde bei einer Vielzahl von epithelialen Karzinomzellen beobachtet (Lo et al., 2007; Lu et al., 2003). Bei zervikalen SCC-Zellen führte die EGF-Stimulation über 72 Stunden mit dem Wechsel zu einer Spindelzell-ähnlichen Morphologie, der Vereinzelnung der Zellen und der Reduktion von E-Cadherin zu übereinstimmenden Veränderungen (Lee et al., 2008).

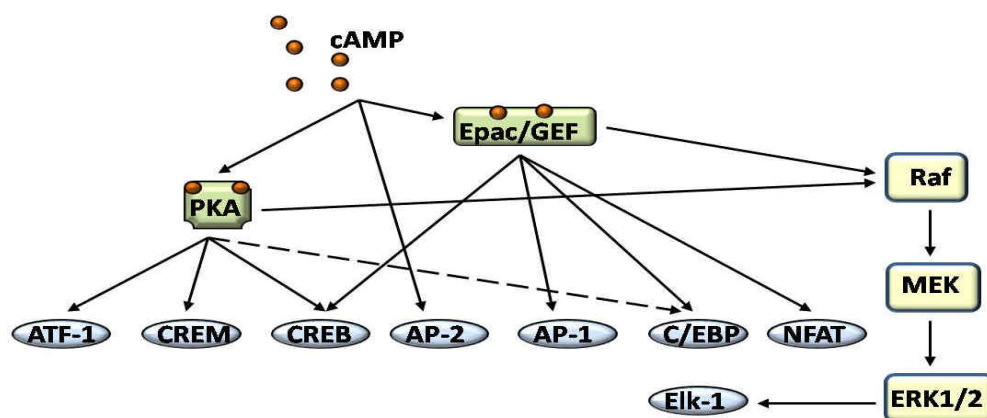
TGF $\beta$  hingegen bewirkte nach 72stündiger Inkubation bei den Hauttumorzellen eine gesteigerte Expression von E-Cadherin sowie Integrin  $\alpha 5$ , eine nur leicht reduzierte Expression von VILIP-1 und einen aufgelockerten Zellverband mit abgerundeten Zellen. Während in einigen Zelltypen die Induktion einer vollständigen EMT durch TGF $\beta$  beschrieben wurde (Ellenrieder et al., 2001; Fujimoto et al., 2001), zeigten andere eine abweichende Reaktion. Beispielsweise wurde auch in humanen Trophoblasten die Expression von E-Cadherin in Folge der TGF $\beta$ -Stimulation erhöht und nicht wie für EMT typisch reduziert (Karmakar and Das, 2004). Für die Induktion von EMT durch TGF $\beta$  ist oftmals eine Hyperaktivierung des Ras-MAPK-Signalweges als Basis nötig, wie in Keratinozyten gezeigt werden konnte. Ohne diese verstärkte Aktivität kommt es lediglich zu reversiblen morphologischen Veränderungen (Santibanez et al., 2003). Dies scheint für die hier untersuchten Zellen zuzutreffen.

Demnach beeinflussten beide Wachstumsfaktoren maßgeblich die Morphologie der Plattenepithelkarzinomzellen, aber nur die Inkubation mit EGF bewirkte diejenigen Veränderungen bei den VILIP-1-positiven Zellen, durch die ihr Phänotyp und ihr Expressionsprofil dem der VILIP-1-negativen angeglichen wurden. In SCC-Zellen kann die chronische Stimulation mit EGF demzufolge EMT induzieren und die Expression von VILIP-1 unterdrücken.

### 5.2.3 Regulation der Expression von Integrin $\alpha 5$ und E-Cadherin

Ob die Expression von E-Cadherin parallel mit der von VILIP-1 während des EMT-Programms herunter reguliert wird oder ob E-Cadherin möglicherweise wie Integrin  $\alpha 5$  cAMP-vermittelt durch VILIP-1 reguliert wird, konnte mittels Western Blot Analysen unter Modulation der VILIP-1-Expression aufgeklärt werden. Sowohl die Suppression als auch die Überexpression von VILIP-1 regulierten in erwarteter Weise (Gonzalez Guerrico et al., 2005) das Expressionsniveau von Integrin  $\alpha 5$ . Die Expression von E-Cadherin blieb im Unterschied dazu unbeeinflusst von der Modulation der VILIP-1-Expression. Daraus kann geschlossen werden, dass in SCC-Zellen die Expression von VILIP-1 und E-Cadherin unabhängig voneinander während der EGF-induzierten EMT supprimiert wird.

Parallel wurden die regulatorischen Sequenzbereiche von Integrin  $\alpha 5$ , E-Cadherin und VILIP-1 selbst auf das Vorkommen von Bindungsstellen cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktoren untersucht, die für eine mögliche Regulation dieser Gene durch cAMP erforderlich wären. Abbildung 5.2.3 gibt einen Überblick über Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch cAMP beeinflusst werden kann. Über den cAMP-PKA-Signalweg und cAMP response Elemente (CREs) in den Zielgenen der CRE-bindenden Faktoren CREB, CREM und ATF1 kann sowohl eine negative als auch eine positive Regulation bewirkt werden. Unabhängig von PKA kann des Weiteren über Epac1 eine cAMP-vermittelte Transkriptionsregulation über AP-1, NF-AT oder C/EBP erfolgen (Sands and Palmer, 2008). Außerdem kann auch die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-2 durch erhöhte cAMP-Spiegel induziert werden (Nyormoi and Bar-Eli, 2003).



**Abb. 5.2.3:** Schema der durch cAMP regulierbare Transkriptionsfaktoren (blau) (nach Sands 2008 und Nyormoi and Bar-Eli 2003).

Für die Analyse der regulatorischen Sequenzen wurden die CREB-Target-Datenbank (CREB-Target-DB) zur Vorhersage von cAMP-Response-Elementen (CREs) genutzt. Außerdem wurden zur allgemeinen Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindungsstellen die Programme Signal Scan und Alibaba, die auf den in der TRANSFAC-Datenbank gespeicherten Informationen beruhen, herangezogen (vergleiche Abschnitt 3.2.10). Da Alibaba derzeit die zuverlässigste Software für die Suche von Transkriptionsfaktorbindungsstellen ist (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>), wurde bei widersprüchlichen Ergebnissen der beiden Programme, auf die von Alibaba zurückgegriffen.

Das Expressionsniveau von Integrin  $\alpha 5$  ist negativ korreliert mit dem von VILIP-1. Es wurde gezeigt, dass dieser Effekt über cAMP-PKA vermittelt wird (Abb. 4.3.1; Gonzalez Guerrico et al., 2005), aber bisher wurde nicht beschrieben wie diese negative Regulation realisiert wird. Bei der Suche nach cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren waren daher für die Integrin  $\alpha 5$  Regulation besonders diejenigen von Interesse, die inhibitorisch wirken können. Über CR-Elemente ist eine Transkriptionsrepression möglich (Sands and Palmer, 2008). Sowohl die Vorhersage der CREB-Target-DB, als auch die Analyse mittels Alibaba und Signal Scan deuteten mit der Identifizierung eines halben, weit vom Transkriptionsstart entfernt liegenden CR-Element jedoch nicht auf die Regulation über CREB, CREM oder ATF-1 hin. AP-1 ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der im Zusammenhang mit cAMP-vermittelter Inhibition diskutiert wird. Diese Annahme beruht auf den Beobachtungen, dass die Stimulation von Epac in Jurkat T-Zellen die c-Jun-vermittelte Transkription inhibiert und dass etliche Gene, die durch Epac-Aktivität supprimiert werden, beispielsweise die GluR1-Untereinheit des ionotropen Glutamatrezeptors und der TNF $\alpha$ -Rezeptor TNFR1, AP-1-Bindungsstellen in ihren Promotoren aufweisen (Fuld et al., 2005; Sands and Palmer, 2008). Die proximalen Promotorregionen vieler  $\alpha$ -Integrin Untereinheiten wurden bereits funktionell charakterisiert. SP-1-Bindungsstellen wurden in Abwesenheit von TATA-Boxen als essentiell für ihre basale und regulierte Expression identifiziert (Lopez-Rodriguez et al., 1995; Ye et al., 1996; Zutter et al., 1997). Der  $\alpha 5$ -Promotor enthält die essentiellen SP-1-Bindungsstellen sowie eine AP-1- und eine C/EBP-Bindungsstelle (Lopez-Rodriguez et al., 1997) (vergleiche auch Alibaba-Ausgabe für Integrin  $\alpha 5$  im Anhang). Allerdings scheint AP-1 eine positive Regulation von Integrin  $\alpha 5$  als Reaktion auf Wachstumsfaktoren oder während der Wundheilung zu bewirken (Su et al., 1996). C/EBP $\beta$  wird ebenfalls ein positiver Effekt auf die Expression von Integrin  $\alpha 5$  während der Wundheilung und in hyperproliferativen epidermalen Zellen zugeschrieben (Koria and Andreadis, 2007). Im Gegensatz dazu konnte jedoch auch festgestellt werden, dass sich C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  inhibierend auf die Promotoraktivität von  $\alpha 2$  und  $\alpha 5$  Integrinen während der terminalen Differenzierung in der Epidermis auswirken

(Swart et al., 1997;Zhu et al., 2002). Darüber hinaus wird cAMP eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der terminalen Differenzierung von Keratinozyten beigemessen (Mammone et al., 1998;McCawley et al., 2000), was für die cAMP-abhängige C/EBP-vermittelte Inhibition der Expression von Integrin  $\alpha 5$  im Differenzierungsprozess spricht. Damit stellt die Regulation der Promotoraktivität des Integrin  $\alpha 5$  Gens durch C/EBP-Faktoren vermutlich im Kontext-spezifischen Zusammenspiel mit SP-1 und AP-1 (Lopez-Rodriguez et al., 1997) auch eine Möglichkeit zur Vermittlung der cAMP-abhängigen Transkriptionseinhibition in SCC-Zellen dar (siehe Abb. 5.1.6 A).

Die Promotorregion von E-Cadherin wurde analysiert, um eine mögliche positive cAMP-vermittelte Regulation durch VILIP-1 . Die Analyse sowohl mit Alibaba und Signal Scan als auch über die CREB-Target-DB ergab keine vollständigen CREs oder CRE-Cluster, was die Transkriptionsregulation über CR-Elemente ausschließt. AP-2 wurde als positiver Regulator der E-Cadherin-Expression und als Repressor der Tumorprogression beschrieben, dessen Expression in hochmalignen Melanozyten ausgeschaltet ist, was zusätzlich zur Verminderung der E-Cadherin-Expression beiträgt (Nyormoi and Bar-Eli, 2003). In der Promotoranalyse konnten, wie zu erwarten war, Bindungsstellen für AP-2 identifiziert werden und weitere für C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$ . Diese Transkriptionsfaktoren könnten demnach positiv zur Expression von E-Cadherin beitragen, unter der Voraussetzung, dass sie selbst exprimiert werden. Da die Expression von VILIP-1 in den VILIP-1-negativen Zelllinien nicht die Expression von E-Cadherin wiederherzustellen vermochte, ist davon auszugehen, dass eine mögliche cAMP-abhängige positive Regulation des E-Cadherin-Gens nicht die während EMT induzierte Inhibition aufheben kann. Es ist folglich denkbar, dass erhöhte cAMP-Konzentrationen die Transkription von E-Cadherin fördern, aber unwahrscheinlich und in diesem Modellsystem nicht nachweisbar, dass cAMP der Supprimierung der Transkription durch EMT-assoziierte Repressoren wie snail-1 entgegenwirken kann.

Die dem Transkriptionsstart des VILIP-1-Gens vorgelagerten Sequenzen wurden im Sinne einer positiven oder negativen cAMP-vermittelten Rückkopplung auf die eigene Expression ebenfalls auf Bindungsstellen der relevanten Transkriptionsfaktoren überprüft. Laut der Vorhersage der CREB-Target-DB und der Analyse mit Alibaba und Signal Scan ist auch VILIP-1 trotz einiger identifizierter halber CREs nicht als potentielles Ziel für eine Regulation über CREB, CREM und ATF1 anzusehen. Für AP-1 oder AP-2 sind Bindungsstellen vorhanden, jedoch liegen diese weit entfernt vom TS. Nur eine der vier AP-2-Konsensussequenzen ist innerhalb des 2 kb Sequenzbereichs enthalten, welcher kürzlich für das humane VILIP-1-Gen als Promotorregion kloniert wurde (Fu et al., 2008). Interessanterweise wurde jedoch beschrieben, dass Gene wie c-KIT und MCAM/MUC18, für

die angenommen wird, dass sie im Verlauf der Tumorprogression aufgrund der verlorengegangenen AP-2-Expression vermindert exprimiert werden, Gemeinsamkeiten im Aufbau ihrer Promotorbereiche aufweisen. Es handelt sich wie auch bei VILIP-1 um GC-reiche Sequenzen, denen die typische TATA-Box fehlt und die eine Vielzahl von Bindungsstellen für den SP-1-Transkriptionsfaktor enthalten (vergleiche Alibaba-Ausgabe für VILIP-1 im Anhang) (Nyormoi and Bar-Eli, 2003). Es wäre also möglich, dass VILIP-1 durch AP-2 eventuell auch im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren positiv reguliert wird. Des Weiteren deuten die vier ermittelten Bindungsstellen für C/EBP $\alpha$  im proximalen Sequenzbereich auf eine Rolle dieses Faktors bei der Regulation der Transkription von VILIP-1 hin. Dessen ungeachtet ergaben sich in Western Blot Analysen nach Inkubation mit cAMP, Forskolin oder dem PKA-Inhibitor H89 (Daten nicht gezeigt) keine Hinweise auf einen Einfluss des cAMP-PKA-Signalweges auf die Expression von VILIP-1.

Zusammengenommen können aus der Promotoranalyse die Rückschlüsse gezogen werden, dass C/EBP-Faktoren für die cAMP-abhängige Inhibition der Expression von Integrin  $\alpha$ 5 in Betracht kommen und dass, obwohl eine cAMP-abhängige Regulation der E-Cadherin-Expression und VILIP-1-Expression bisher nicht nachgewiesen wurde, AP-2 und/oder C/EBP $\alpha$  möglicherweise eine Rolle für die Transkription dieser Gene spielen.

#### **5.2.4 Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors snail-1**

In einer Vielzahl von Studien wurde inzwischen umfassend beschrieben, dass das E-Cadherin-Gen während der EMT Ziel einer nachhaltigen Inaktivierung durch verschiedene Transkriptionsfaktoren ist. Einer dieser Repressoren ist snail-1, ein Vertreter der Zinkfinger-DNA-Bindungsproteine (Cano et al., 2000). Drei der entsprechenden Bindungsstellen für snail-1, sogenannte E-Box-Elemente mit der Konsensussequenz CAC/GC/GTG, wurden in der regulatorischen Sequenz des E-Cadherin-Gens nachgewiesen (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). Zu den Zielgenen von snail-1 gehören ferner Claudin und Occludin, als Bestandteile von tight junctions, das Glykoprotein Mucin1, der Tumorsuppressor p53 und snail-1 selbst. Im Promotorbereich von snail-1 wurde eine E-Box identifiziert, über die eine moderate Repression im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife zur Vermeidung einer zu starken snail-1-Expression nach transienter Wachstumsfaktorstimulation erzielt werden kann (Peiro et al., 2006). Basierend auf den im Modellsystem beobachteten Unterschieden in Morphologie, Wachstumsverhalten und Expressionsprofil zwischen den aggressiven, VILIP-1

negativen und den weniger aggressiven, VILIP-1-positiven SCC-Zelllinien stellte sich die Frage, ob die Aktivität von snail-1 damit im Zusammenhang steht.

RT-PCR-Analysen zeigten, dass snail-1 ausschließlich in den aggressiven VILIP-1- und E-Cadherin-negativen Zellen exprimiert wird. Demzufolge ist es naheliegend, dass snail-1 die Expression von E-Cadherin in den aggressiven SCC-Zelllinien unterdrückt. Eine inverse Korrelation der Expression von snail-1 und E-Cadherin wurde auch in anderen SCC-Zellen, wie oralen Plattenepithelkarzinomzellen nachgewiesen (Yokoyama et al., 2001). Außerdem ließ sich die snail-1-Expression in den VILIP-1-positiven Zellen durch Stimulation mit EGF induzieren, während die Expression von E-Cadherin sowie die VILIP-1-Expression infolge dessen reduziert wurden. Snail-1 könnte folglich ebenso für die verminderte Expression von VILIP-1 ursächlich sein. Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Regulation von VILIP-1 durch den Transkriptionsfaktor snail-1 gab die Analyse der regulatorischen Sequenzen, die dem Transkriptionsstart im VILIP-1-Gen der Maus vorgelagert sind. Dabei wurden drei E-Box-Elemente im Bereich 3 kb aufwärts vom TS identifiziert, eine davon im 2 kb Bereich, der kürzlich für das humane VILIP-1-Gen als Promotorregion kloniert wurde (Fu et al., 2008).

In den RT-PCR-Experimenten zeigte sich des Weiteren, dass durch Zugabe von Forskolin der EGF-induzierten snail-1-Expression entgegengewirkt werden kann. Daraus ergab sich die Hypothese, dass die Expression von snail-1 über cAMP-abhängige Signalwege regulierbar ist und die Inhibition der VILIP-1-Expression zur Stabilisierung der snail-1-Expression beiträgt. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden die vorhandenen snail-1-Transkripte nach Transfektion von GFP-VILIP-1 beziehungsweise VILIP-1-siRNA amplifiziert. Die Supprimierung von VILIP-1 führte zwar nicht zur Induktion der Expression von snail-1, aber tatsächlich wurde die snail-1-Expression nach dem Einbringen von VILIP-1 in die VILIP-1-negativen Zellen abgeschwächt. Dadurch wird die Hypothese bestätigt, dass VILIP-1 die Expression von snail-1 zu reduzieren vermag, vermutlich über cAMP-abhängige Signalwege.

Die Analyse des Promotorbereichs von snail-1 auf Konsensussequenzen cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktoren ergab fünf AP-2- und vier C/EBP $\alpha$ -Bindungsstellen. Vor allem die Bindungsstellen für C/EBP $\alpha$  stellen eine Möglichkeit dar über die eine direkte cAMP-vermittelte Inhibition der snail-1-Transkription realisiert werden könnte. Weitere Experimente wären nötig, um diese direkte Regulation tatsächlich nachzuweisen. Die Möglichkeit einer indirekten Beeinflussung der snail-1-Expression durch VILIP-1 beziehungsweise cAMP wäre durch Wechselwirkungen von cAMP-abhängigen Signalwegen mit den Aktivierungswegen der snail-1-Transkription gegeben (vergleiche Abb. 5.2.7). Im snail-1-Promotorbereich sind Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren AP-1, SMAD, LEF1, und NF- $\kappa$ B, welche die

Transkription von snail-1 aktivieren, bereits beschrieben worden (Bachelder et al., 2005; Peinado et al., 2007). Dabei ist AP-1 in die Wachstumsfaktor-vermittelte Induktion von snail-1, SMAD in die Induktion über TGF $\beta$ , LEF1 in die  $\beta$ -Catenin-vermittelte Induktion und NF- $\kappa$ B in die Induktion über den PI3K-GSK3-Signalweg involviert (Abb. 5.2.7 B). Besonders mit Berücksichtigung der VILIP-1-bedingten Expressionsunterschiede von Integrin  $\alpha$ 5 im Modellsystem, wäre folgender Mechanismus zur indirekten Regulation der snail-1-Expression durch VILIP-1 vorstellbar. Es wurde gezeigt, dass Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 über die  $\beta$ 1-Untereinheit mit ILK (Integrin linked kinase) interagiert. ILK wiederum kann über PKB/Akt NF- $\kappa$ B aktivieren und inhibiert GSK3. Die Phosphorylierung von snail-1 durch GSK3 führt zum Export des Transkriptionsfaktors aus dem Nukleus und zu seiner Degradierung. Da die Expression von VILIP-1 cAMP-vermittelt zur verminderten Expression von Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 führt, ist anzunehmen, dass infolgedessen die Aktivität der ILK herabgesetzt wird und dadurch zum einen die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression von snail-1 reduziert wird und zum anderen vorhandene snail-1-Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern ausgeschleust und abgebaut werden (Abb. 5.2.7 A). Diese Zusammenhänge könnten den beobachteten Effekt von FSK auf die durch EGF bewirkte Induktion der snail-1-Expression erklären und könnten in Aktivitätsstudien mit dem snail-1-Promotor in Abhängigkeit vom cAMP-Spiegel und der VILIP-1-Expressionsstärke einerseits, sowie der Expressionsstärke von Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 andererseits überprüft werden.

Somit ist Snail-1 in den untersuchten SCC-Zellen sowohl mit der Expression von E-Cadherin- als auch mit der VILIP-1-Expression invers korreliert. Die Transkription von VILIP-1 wird möglicherweise wie die von E-Cadherin durch snail-1 unterdrückt. Umgekehrt kann VILIP-1, vermutlich über cAMP-vermittelte Effekte, das Expressionsniveau von snail-1 reduzieren.

### **5.2.5 Zelldissoziation und -migration nach EGF-Stimulation**

Da die Stimulation mit EGF als Auslöser für die Unterschiede in der Expression von Integrin  $\alpha$ 5, E-Cadherin und VILIP-1 identifiziert werden konnte, war es naheliegend auch den Einfluss des Wachstumsfaktors auf das Dissoziationsverhalten und das Migrationsvermögen der weniger aggressiven VILIP-1-positiven Zelllinien zu untersuchen. Die Dissoziation wurde in diesen Zellen durch die Inkubation mit EGF in gleicher Weise beschleunigt wie durch die Unterdrückung der VILIP-1-Expression durch siRNA. Die Auswirkungen von EGF oder snail-1 auf das Dissoziationsverhalten von Tumorzellen wurden bisher kaum untersucht. Haraguchi et al. zeigten jedoch ebenfalls, dass die Expression von snail-1 in epithelialen



Karzinomzellen die Dissoziation von Fibronektinsubstrat steigert. Die snail-1-Expression induzierte außerdem die Expression von MMP-9 und der Integrinuntereinheiten  $\alpha v$  und  $\alpha 5$  (Jorda et al., 2005). Die erhöhte  $\alpha v$  und  $\alpha 5$  Integrin-Expression ist jedoch auch in dieser Studie nicht ausreichend, um die Dissoziation der Zellen zu verlangsamen (Haraguchi et al., 2008). Als mögliche Ursache für diesen Effekt werden von den Autoren snail-1-vermittelte Veränderungen in der Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix, wie Laminin 5 und den dazugehörigen Integrinrezeptoren (Takkunen et al., 2006) diskutiert. Die Reduktion von Zell-Zellkontakten wurde von Haraguchi et al. nicht untersucht, ist aber ebenso als entscheidender Einflussfaktor anzunehmen. Für das in der vorliegenden Arbeit analysierte Modellsystem kann alternativ folgender, sich mit anhaltender EGF-Inkubation verstärkender Mechanismus vorgeschlagen werden. Zunächst bewirkt EGF die Endozytose von E-Cadherin. Durch das dadurch freiwerdende  $\beta$ -Catenin und durch die Aktivierung der MAPK-Kaskade wird die Expression von snail-1 induziert (vergleiche Abb. 5.2.7 B). Der Transkriptionsrepressor vermindert infolgedessen die Expression von E-Cadherin und vermutlich auch von VILIP-1. Die EGF-vermittelte Beseitigung der Expression beider Proteine führt zur Stabilisierung von  $\alpha 5 \beta 1$  Integrinkomplexen. Diese können dann zur Verstärkung der Wachstumsfaktorsignalgebung beitragen, indem sie zusätzlich den ILK-PKB/AKT-GSK3-Signalweg aktivieren, wodurch wiederum Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und snail-1 aktiviert werden, die den EMT-Prozess vorantreiben und das Dissoziationsverhalten beschleunigen.

In den durchgeführten Analysen konnte ein gesteigertes Migrationsverhalten der VILIP-1-positiven SCC-Zellen nach EGF-Stimulation beobachtet werden. Dieser Effekt ließe sich ebenfalls auf den oben beschriebenen Mechanismus zurückzuführen, wobei für die Migration die verstärkte Integrin-Expression entscheidender sein dürfte als die verminderte E-Cadherin-Expression. Die Auswirkungen von EGF auf das Migrationsvermögen von Tumorzellen wurden bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben. Dabei wurde immer, wie in den hier durchgeführten Experimenten eine erhöhte Motilität nach EGF-Stimulation festgestellt (Ahmed et al., 2006; de et al., 2005a; McCawley et al., 2000). Des Weiteren wurde gezeigt, dass cAMP die Effekte einer EGF-Stimulation potenzieren kann, beispielsweise in Zellen der Cornea oder bei Leberkarzinomen (Fujikawa et al., 2007; Nakamura and Nishida, 2003). Gegensätzliche Studien in Keratinozyten und epithelialen Leberzellen belegen jedoch, dass cAMP die Verstärkung der Migration umkehren kann (Manske et al., 1990; McCawley et al., 2000). Für die hier untersuchten SCC-Zellen konnte deutlich festgestellt werden, dass 8Br-cAMP der EGF-induzierten Zunahme der Zellmotilität entgegenwirkt. Die Anzahl migrierender Zellen in den Wundbereichen war sogar geringer als in der Kontrollgruppe ohne EGF-Stimulation. Es muss daher einerseits in Betracht gezogen werden, dass der die

Migration stark einschränkende Effekt von cAMP (vergleiche Abb. 4.2.4.2 und Abschnitt 5.1.2) auf einem anderen Signalweg vermittelt wird als der die Migration steigernde Effekt der EGF-Stimulation. Andererseits wäre auch die zelltypspezifische Verschaltung von cAMP-Signalwegen und der MAPK-Kaskade, über deren Aktivierung das EGF-Signal die Migration beeinflusst, eine Erklärung für die verschiedenen Auswirkungen von cAMP auf EGF-induzierte Effekte. Die Verknüpfung der beiden Signalwege findet auf Ebene von Raf statt und die exprimierte Raf-Isoform bestimmt, ob sich cAMP aktivierend oder inhibierend auf die Aktivität der nachgeschalteten Kaskade auswirkt (Dumaz and Marais, 2005; Pursiheimo et al., 2002). In Keratinozyten, von denen sich die untersuchten SCC-Zellen ableiten, wurde die Expression von B-Raf nachgewiesen (Takahashi et al., 2004). Für diese Raf-Isoform wurde beschrieben, dass cAMP über PKA- und Rap-1-vermittelte Schritte ihre Aktivierung bewirkt (Busca et al., 2000; MacNicol and MacNicol, 1999), im Unterschied zur cAMP-vermittelten Inhibition der Isoform Raf1 (D'Angelo et al., 1997; Ramstad et al., 2000). Zudem wurde in Keratinozyten gezeigt, dass die Art, auf die cAMP die Aktivität der MAPK-Kaskade beeinflusst, außerdem abhängig ist von der differentiellen Expression zweier unterschiedlich großer B-Raf-Isoformen (Takahashi et al., 2004). Daher würde nur eine spezifische Analyse der Raf-Expression Aufschluss darüber erbringen, wie cAMP in SCC-Zellen die Aktivität der MAPK-Kaskade beeinflusst und ob cAMP über diese Wechselwirkung die beobachtete, EGF-induzierte Zunahme der Zellmigration hemmt.

Aus den aufgeführten Ergebnissen lässt sich insgesamt ableiten, dass die 72-stündige Inkubation mit EGF vermutlich über eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen die Dissoziation sowie die Migration der VILIP-1-positiven Zellen verstärkt. Der gesteigerten Migration nach EGF-Stimulation kann durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels entgegengewirkt werden.

### 5.2.6 Signalwege bei der Regulation der Zellmigration

Ausgehend vom EGF-Rezeptor können außer der MAPK-Kaskade auch PI3K und GSK3 über ihre nachgeschalteten Signalwege die Migration modulieren (Billadeau, 2007; Viala and Pouyssegur, 2004; Keely et al., 1997). Erste Hinweise auf die beteiligten Signalwege bei der Regulation der Migration gaben weitere *in vitro* Migrationsanalysen bei den aggressiven Plattenepithelkarzinomzellen unter Einsatz von Kinaseinhibitoren. Durch die verminderte Anzahl migrierender SCC-Zellen nach Inkubation mit Inhibitoren von MEK und ERK1/2 bestätigte sich Bedeutung des MAPK-Signalwegs für das Migrationsverhalten der Zellen. Die

inhibierte Signalgebung über PI3K und die Hemmung der p38-Aktivität reduzierten ebenfalls die Motilität der SCC-Zellen. JNK und GSK3 scheinen keine Auswirkungen auf das Migrationsverhalten der SCC-Zellen zu haben, da die Inhibition dieser Kinasen zu keinerlei Veränderung in den durchgeführten Analysen führte. Diese Ergebnisse werden gestützt durch eine Vielzahl anderer Studien. In ovarialen Tumorzellen wurde beschrieben, dass die Inhibition sowohl von PI3K als auch von ERK1/2 die EGF-induzierte Zellmigration beeinträchtigt. Dabei wirkte sich PI3K über die Modulation der MMP9-Aktivität und ERK1/2 vor allem über den Abbau der Zell-Zellverbindungen auf die Motilität der Zellen aus (Ellerbroek et al., 2003). Ahmed et al. zeigten analog durch den Einsatz von Kinaseinhibitoren in Migrations-/Wundheilungsstudien, dass sowohl PI3K als auch ERK1/2 in die Regulation der Zellmotilität involviert sind (Ahmed et al., 2006). In Keratinozyten wurde ebenfalls nachgewiesen, dass die EGF-induzierte Steigerung der Motilität über ERK1/2 vermittelt wird (McCawley et al., 1999). Jedoch wurde die Inhibition der EGF-vermittelten Motilität durch cAMP nicht über ERK1/2 sondern über JNK und p38-MAPK realisiert (McCawley et al., 2000).

Aufgrund der hier beobachteten Bedeutung des MEK-ERK1/2-Signalweges für das Migrationsvermögen der SCC-Zellen und da cAMP vermutlich eine wichtige Rolle bei der Modulation der MAPK-Aktivität spielt, könnten Analysen der Aktivität des MAPK-Signalweges in Abhängigkeit vom VILIP-1-Expressionsniveau, dem cAMP-Spiegel und der EGF-Stimulation weitere Erkenntnisse über die Regulation des Metastasierungspotentials der Hauttumorzellen liefern.

### 5.2.7 Fazit

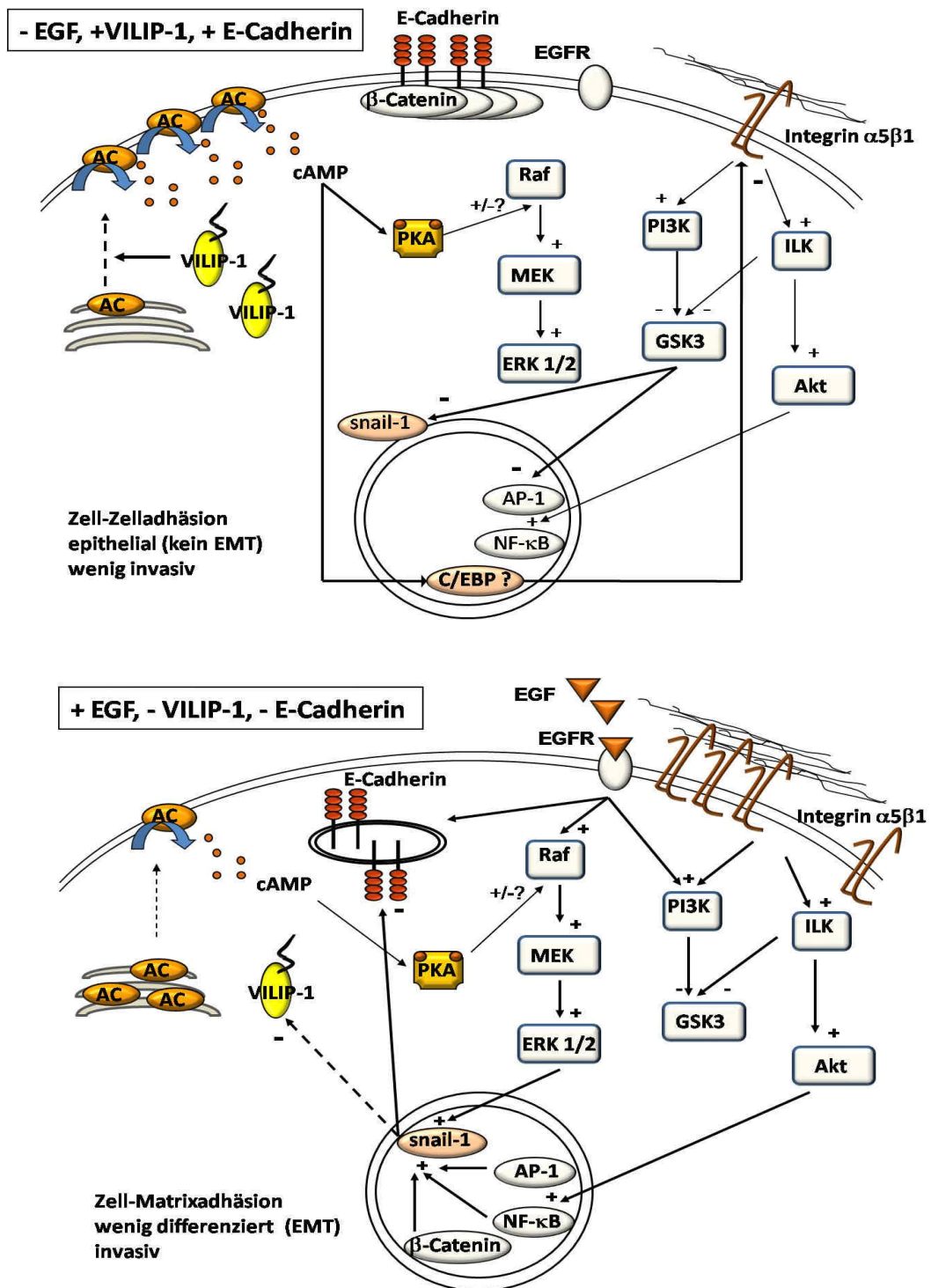
Aus den Experimenten zur Rolle von VILIP-1 als Einflussfaktor bei der Tumorprogression von SCC-Zellen der Haut können zusammenfassend folgende in Abbildung 5.2.7 dargestellten Schlussfolgerungen gezogen werden:

- 1) Die chronische Stimulation mit EGF induziert bei den VILIP-1-exprimierenden Zellen EMT und führt zur Angleichung ihres Phänotyps an den der VILIP-1-negativen Zellen inklusive des Verlusts der VILIP-1-Expression.
- 2) C/EBP-Faktoren sind Kandidaten für die Realisierung der durch VILIP-1-cAMP-bedingten Inhibition der Expression von Integrin  $\alpha 5$  (Abb. 5.2.7 A). Die Expression

von E-Cadherin ist in VILIP-1 negativen SCC-Zellen ausgeschaltet, wird aber im Unterschied zur Expression von Integrin  $\alpha 5$  nicht durch VILIP-1 reguliert.

- 3) Der Transkriptionsrepressor snail-1 bewirkt neben der Herabsetzung der E-Cadherin-Expression vermutlich auch die der VILIP-1-Expression bei der EGF-induzierten EMT (Abb. 5.2.7 A) und wird selbst wiederum durch VILIP-1 in seiner Expression reduziert (Abb. 5.2.7 B).
- 4) EGF erhöht bei den weniger aggressiven, VILIP-1-positiven Zellen das Metastasierungspotential durch Beschleunigung der Dissoziation und Steigerung der Motilität, woran die Aktivität der MAPK-Kaskade maßgeblich beteiligt ist, welche sich wiederum durch cAMP-abhängige Signalwege beeinflussen lässt (Abb. 5.2.7 B).

Mit der Regulation von Integrin  $\alpha 5$  und snail-1, zwei für EMT und Invasion bedeutsamen Einflussfaktoren, wird die Bedeutung von VILIP-1 als Suppressor der Tumorprogression unterstrichen und eine protektive Funktion während des EMT-Prozesses angedeutet. Weiterhin wird durch die Herunterregulation der VILIP-1-Expression während der EGF-induzierten EMT die Eignung von VILIP-1 als diagnostischer Marker beziehungsweise als Marker für Differenzierung bei Plattenepithelzelltumoren untermauert. Die Hemmung der EGF-induzierten Steigerung des Metastasierungspotentials der SCC-Zellen durch Erhöhung des cAMP-Spiegels und eine mögliche cAMP-vermittelte Inhibition des MAPK-Signalweges weisen wiederum VILIP-1 und cAMP als interessante Ansatzpunkte für therapeutische Strategien aus.



**Abb. 5.2.7:** In SCC-Zellen ermittelte Zusammenhänge zur Rolle von VILIP-1 bei der Tumorprogression. (farbig: in diesem Modellsystem bereits nachgewiesene Effekte, grau: ergänzende Zusammenhänge aus Literaturangaben, + positiver Einfluss auf Aktivität oder Expression - negativer Einfluss). VILIP-1-positive Zellen exprimieren ebenfalls E-Cadherin, zeigen jedoch eine verminderte Expression von Integrin  $\alpha5$  und keine snail-1-Expression. Während der EGF-induzierten EMT gehen die Expression von VILIP-1 und E-Cadherin verloren und die Expression von snail-1 und Integrin  $\alpha5$  nimmt zu. Sowohl VILIP-1 als auch cAMP können der Expression von snail-1 entgegenwirken. cAMP-vermittelt kann auch die EGF-induzierte gesteigerte Motilität reduziert werden.

### 5.3 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten liefern diverse interessante Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen sowohl zur Aufklärung der Funktion von VILIP-1 im Allgemeinen, als auch zu VILIP-1-assoziierten Wirkmechanismen im Kontext der Tumorprogression. Besonders für die Entwicklung therapeutischer Strategien zur Senkung des Metastasierungspotentials von SCC-Zellen, beispielsweise basierend auf Substanzen, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, könnten zukünftige, auf den Ergebnissen dieser Arbeit aufbauende Studien einen Beitrag liefern.

Eine mögliche Zielstellung wäre, den Signalweg, welcher die EGF-induzierte Inhibition der VILIP-1-Expression vermittelt, mittels Kinaseinhibitoren und Antikörpern zum Nachweis des Aktivierungszustands von Kinasen detailliert zu beschreiben sowie die Inhibition der VILIP-1-Expression über die identifizierten Bindungsstellen des Repressors snail-1 im Promotorbereich des VILIP-1-Gens nachzuweisen, um dem Verlust der Expression von VILIP-1 entgegenzuwirken.

Die Analyse der cAMP-vermittelten Modulation der durch EGF aktivierten Signalwege und der durch EGF induzierten Effekte, welche die Aggressivität der SCC-Zellen erhöhen, wäre eine weitere reizvolle Weiterführung dieser Arbeit. Diese könnten durch Identifizierung der in SCC-Zellen exprimierten Raf-Isoformen und Analysen der Aktivität des MAPK-Signalweges in Abhängigkeit vom VILIP-1-Expressionsniveau, dem cAMP-Spiegel und der EGF-Stimulation aufgeklärt werden.

Darüber hinaus könnte auch die Charakterisierung, der ermittelten cAMP-abhängigen Inhibition der Expression von Integrin  $\alpha 5$  und snail-1 in Studien zur Promotoraktivität unter Modulation des Expressionsniveaus von VILIP-1 beziehungsweise nach Mutation der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren, wie C/EBP  $\alpha$  und  $\beta$ , angegangen werden.

Von besonderem Interesse wäre außerdem die detaillierte Analyse der Beeinflussung der Oberflächenexpression von Adenylatzyklasen durch VILIP-1. Der Nachweis einer möglichen Interaktion von VILIP-1 mit einer spezifischen Adenylatzyklase-Isoform, wie bereits für Guanylatzyklase B (NPR-B) oder den nikotinischen  $\alpha 4\beta 2$  AChR erbracht, würde einen Vergleich der Interaktionspartner erlauben und möglicherweise zur Identifizierung eines gemeinsamen Interaktionsmotiv oder eines allgemeinen Mechanismus zur Steuerung der Oberflächenexpression bestimmter Membranrezeptoren führen. Alternativ könnte die Kolokalisation von VILIP-1 mit Faktoren, die an Membrantransportprozessen und

Rezeptorrecycling beteiligt sind, einen indirekten Effekt von VILIP-1 auf die Oberflächenexpression von Membranrezeptoren aufzeigen. Die Aufklärung solcher Mechanismen wäre nicht nur bedeutsam für eine Modulation cAMP-abhängiger anti-invasiver Effekte in Plattenepithelkarzinomzellen, sondern auch im Kontext mit anderen Prozessen, die VILIP-1 cAMP-vermittelt reguliert, wie die Steuerung der Insulinsynthese in pankreatischen Zellen (Dai et al. 2005) oder die Regulation der neuronalen Differenzierung beziehungsweise morphologischen Plastizität von Neuronen (Schönrath et al. in Vorbereitung).

## 6 Literaturverzeichnis

### Reference List

Adams VR, Leggas M (2007) Sunitinib malate for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors. *Clin Ther* 29:1338-1353.

Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, Unger WG, Dedhar S, Auersperg N (2006) Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1532-C1542.

Albelda SM, Smith CW, Ward PA (1994) Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 8:504-512.

Arlt A, Gehrz A, Muerkoster S, Vorndamm J, Kruse ML, Folsch UR, Schafer H (2003) Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 22:3243-3251.

Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, de Herreros AG, Mercurio AM (2005) Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 168:29-33.

Barnhart BC, Simon MC (2007) Metastasis and stem cell pathways. *Cancer Metastasis Rev* 26:261-271.

Bastianelli E, Polans AS, Hidaka H, Pochet R (1995) Differential distribution of six calcium-binding proteins in the rat olfactory epithelium during postnatal development and adulthood. *J Comp Neurol* 354:395-409.

Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De HA (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2:84-89.

Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275:1930-1934.

Berger JC, Vander Griend DJ, Robinson VL, Hickson JA, Rinker-Schaeffer CW (2005) Metastasis suppressor genes: from gene identification to protein function and regulation. *Cancer Biol Ther* 4:805-812.

Bernstein HG, Baumann B, Danos P, Diekmann S, Bogerts B, Gundelfinger ED, Braunewell KH (1999) Regional and cellular distribution of neural visinin-like protein immunoreactivities (VILIP-1 and VILIP-3) in human brain. *J Neurocytol* 28:655-662.

Bernstein HG, Becker A, Keilhoff G, Spilker C, Gorczyca WA, Braunewell KH, Grecksch G (2003) Brain region-specific changes in the expression of calcium sensor proteins after repeated applications of ketamine to rats. *Neurosci Lett* 339:95-98.

Bernstein HG, Braunewell KH (2009) Some notes on visinin-like protein 1 and Alzheimer disease. *Clin Chem* 55:1041-1043.



- Bernstein HG, Braunewell KH, Spilker C, Danos P, Baumann B, Funke S, Diekmann S, Gundelfinger ED, Bogerts B (2002) Hippocampal expression of the calcium sensor protein visinin-like protein-1 in schizophrenia. *Neuroreport* 13:393-396.
- Billadeau DD (2007) Primers on molecular pathways. The glycogen synthase kinase-3beta. *Pancreatology* 7:398-402.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Brand-Saberi B (1996) Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat (Basel)* 156:217-226.
- Birchmeier W (1995) E-cadherin as a tumor (invasion) suppressor gene. *Bioessays* 17:97-99.
- Boekhoff I, Braunewell KH, Andreini I, Breer H, Gundelfinger E (1997) The calcium-binding protein VILIP in olfactory neurons: regulation of second messenger signaling. *Eur J Cell Biol* 72:151-158.
- Boran MS, Garcia A (2007) The cyclic GMP-protein kinase G pathway regulates cytoskeleton dynamics and motility in astrocytes. *J Neurochem* 102:216-230.
- Brackmann M, Schuchmann S, Anand R, Braunewell KH (2005) Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor protein VILIP-1 affects cGMP signalling of guanylyl cyclase B by regulating clathrin-dependent receptor recycling in hippocampal neurons. *J Cell Sci* 118:2495-2505.
- Brackmann M, Zhao C, Schmieden V, Braunewell KH (2004) Cellular and subcellular localization of the inhibitory glycine receptor in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 324:1137-1142.
- Braunewell K, Riederer P, Spilker C, Gundelfinger ED, Bogerts B, Bernstein HG (2001a) Abnormal localization of two neuronal calcium sensor proteins, visinin-like proteins (vilips)-1 and -3, in neocortical brain areas of Alzheimer disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12:110-116.
- Braunewell KH (2005) The darker side of Ca<sup>2+</sup> signaling by neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensor proteins: from Alzheimer's disease to cancer. *Trends Pharmacol Sci* 26:345-351.
- Braunewell KH, Brackmann M, Manahan-Vaughan D (2003) Group I mGlu receptors regulate the expression of the neuronal calcium sensor protein VILIP-1 in vitro and in vivo: implications for mGlu receptor-dependent hippocampal plasticity? *Neuropharmacology* 44:707-715.
- Braunewell KH, Brackmann M, Schaupp M, Spilker C, Anand R, Gundelfinger ED (2001b) Intracellular neuronal calcium sensor (NCS) protein VILIP-1 modulates cGMP signalling pathways in transfected neural cells and cerebellar granule neurones. *J Neurochem* 78:1277-1286.
- Braunewell KH, Gundelfinger ED (1997) Low level expression of calcium-sensor protein VILIP induces cAMP-dependent differentiation in rat C6 glioma cells. *Neurosci Lett* 234:139-142.
- Braunewell KH, Gundelfinger ED (1999) Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res* 295:1-12.

- Braunewell KH, Klein-Szanto AJ (2009) Visinin-like proteins (VSNLs): interaction partners and emerging functions in signal transduction of a subfamily of neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensor proteins. *Cell Tissue Res* 335:301-316.
- Braunewell KH, Spilker C, Behnisch T, Gundelfinger ED (1997) The neuronal calcium-sensor protein VILIP modulates cyclic AMP accumulation in stably transfected C6 glioma cells: amino-terminal myristoylation determines functional activity. *J Neurochem* 68:2129-2139.
- Burgoyne RD, O'Callaghan DW, Hasdemir B, Haynes LP, Tepikin AV (2004) Neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensor proteins: multitasking regulators of neuronal function. *Trends Neurosci* 27:203-209.
- Burgoyne RD, Weiss JL (2001) The neuronal calcium sensor family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Biochem J* 353:1-12.
- Busca R, Abbe P, Mantoux F, Aberdam E, Peyssonnaud C, Eychene A, Ortonne JP, Ballotti R (2000) Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO J* 19:2900-2910.
- Buxbaum JD (2004) A role for calsenilin and related proteins in multiple aspects of neuronal function. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1140-1144.
- Cai Z, Zhou Y, Lei T, Chiu JF, He QY (2009) Mammary serine protease inhibitor inhibits epithelial growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition of esophageal carcinoma cells. *Cancer* 115:36-48.
- Campos SB, Ashworth SL, Wean S, Hosford M, Sandoval RM, Hallett MA, Atkinson SJ, Molitoris BA (2009) Cytokine-induced F-actin reorganization in endothelial cells involves RhoA activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F487-F495.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2:76-83.
- Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T (2001) The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21:8184-8188.
- Chaumont S, Compan V, Toulme E, Richler E, Housley GD, Rassendren F, Khakh BS (2008) Regulation of P2X2 receptors by the neuronal calcium sensor VILIP1. *Sci Signal* 1:ra8.
- Chen CH, Lai JM, Chou TY, Chen CY, Su LJ, Lee YC, Cheng TS, Hong YR, Chou CK, Whang-Peng J, Wu YC, Huang CY (2009a) VEGFA upregulates FLJ10540 and modulates migration and invasion of lung cancer via PI3K/AKT pathway. *PLoS ONE* 4:e5052.
- Chen JS, Wang Q, Fu XH, Huang XH, Chen XL, Cao LQ, Chen LZ, Tan HX, Li W, Bi J, Zhang LJ (2009b) Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. *Hepatol Res* 39:177-186.
- Chen L, Zhang JJ, Huang XY (2008) cAMP inhibits cell migration by interfering with Rac-induced lamellipodium formation. *J Biol Chem* 283:13799-13805.

- Chen TC, Hinton DR, Zidovetzki R, Hofman FM (1998) Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Lab Invest* 78:165-174.
- Christofori G, Semb H (1999) The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24:73-76.
- D'Angelo G, Lee H, Weiner RI (1997) cAMP-dependent protein kinase inhibits the mitogenic action of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor in capillary endothelial cells by blocking Raf activation. *J Cell Biochem* 67:353-366.
- Dai FF, Zhang Y, Kang Y, Wang Q, Gaisano HY, Braunewell KH, Chan CB, Wheeler MB (2006) The neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor protein visinin-like protein-1 is expressed in pancreatic islets and regulates insulin secretion. *J Biol Chem* 281:21942-21953.
- de CB, Gilbert B, Stove C, Bruyneel E, van RF, Berx G (2005a) The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res* 65:6237-6244.
- de CB, van RF, Berx G (2005b) Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal* 17:535-547.
- De RS, Comte M, Nef P, Lenz SE, Gundelfinger ED, Cox JA (1995) Distribution pattern of three neural calcium-binding proteins (NCS-1, VILIP and recoverin) in chicken, bovine and rat retina. *Histochem J* 27:524-535.
- Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S (1998) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11211-11216.
- Dizhoor AM, Hurley JB (1999) Regulation of photoreceptor membrane guanylyl cyclases by guanylyl cyclase activator proteins. *Methods* 19:521-531.
- Duda T, Fik-Rymarkiewicz E, Venkataraman V, Krishnan A, Sharma RK (2004) Calcium-modulated ciliary membrane guanylate cyclase transduction machinery: constitution and operational principles. *Mol Cell Biochem* 267:107-122.
- Dumaz N, Marais R (2005) Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J* 272:3491-3504.
- Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gress TM (2001) Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 61:4222-4228.
- Ellerbroek SM, Wennerberg K, Burridge K (2003) Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem* 278:19023-19031.
- Estrada Y, Dong J, Ossowski L (2009) Positive crosstalk between ERK and p38 in melanoma stimulates migration and in vivo proliferation. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:66-76.

- Fernandez-Sauze S, Grall D, Cseh B, Van Obberghen-Schilling E (2009) Regulation of fibronectin matrix assembly and capillary morphogenesis in endothelial cells by Rho family GTPases. *Exp Cell Res* 315:2092-2104.
- Frisch SM (2000) cAMP takes control. *Nat Cell Biol* 2:E167-E168.
- Fu J, Fong K, Bellacosa A, Ross E, Apostolou S, Bassi DE, Jin F, Zhang J, Cairns P, Ibanez dC, I, Braunewell KH, Klein-Szanto AJ (2008) VILIP-1 downregulation in non-small cell lung carcinomas: mechanisms and prediction of survival. *PLoS ONE* 3:e1698.
- Fujikawa T, Shiraha H, Nakanishi Y, Takaoka N, Ueda N, Suzuki M, Shiratori Y (2007) Cimetidine inhibits epidermal growth factor-induced cell signaling. *J Gastroenterol Hepatol* 22:436-443.
- Fujimoto K, Sheng H, Shao J, Beauchamp RD (2001) Transforming growth factor-beta1 promotes invasiveness after cellular transformation with activated Ras in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 266:239-249.
- Fuld S, Borland G, Yarwood SJ (2005) Elevation of cyclic AMP in Jurkat T-cells provokes distinct transcriptional responses through the protein kinase A (PKA) and exchange protein activated by cyclic AMP (EPAC) pathways. *Exp Cell Res* 309:161-173.
- Gavert N, Ben-Ze'ev A (2008) Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med* 14:199-209.
- Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:793-805.
- Gierke P, Zhao C, Bernstein HG, Noack C, Anand R, Heinemann U, Braunewell KH (2008) Implication of neuronal Ca<sup>2+</sup> -sensor protein VILIP-1 in the glutamate hypothesis of schizophrenia. *Neurobiol Dis* 32:162-175.
- Gierke P, Zhao C, Brackmann M, Linke B, Heinemann U, Braunewell KH (2004) Expression analysis of members of the neuronal calcium sensor protein family: combining bioinformatics and Western blot analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 323:38-43.
- Gilcrease MZ (2007) Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett* 247:1-25.
- Gimond C, van Der FA, van DS, Brakebusch C, Kuikman I, Collard JG, Fassler R, Sonnenberg A (1999) Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. *J Cell Biol* 147:1325-1340.
- Gonzalez Guerrico AM, Jaffer ZM, Page RE, Braunewell KH, Chernoff J, Klein-Szanto AJ (2005) Visinin-like protein-1 is a potent inhibitor of cell adhesion and migration in squamous carcinoma cells. *Oncogene* 24:2307-2316.
- Gotschel F, Kern C, Lang S, Sparna T, Markmann C, Schwager J, McNelly S, von WF, Laufer S, Hecht A, Merfort I (2008) Inhibition of GSK3 differentially modulates NF-kappaB, CREB, AP-1 and beta-catenin signaling in hepatocytes, but fails to promote TNF-alpha-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 314:1351-1366.

- Grimes CA, Jope RS (2001) CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem* 78:1219-1232.
- Guilford P (1999) E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today* 5:172-177.
- Guo W, Malin SA, Johns DC, Jeromin A, Nerbonne JM (2002) Modulation of Kv4-encoded K(+) currents in the mammalian myocardium by neuronal calcium sensor-1. *J Biol Chem* 277:26436-26443.
- Han SU, Kim HT, Seong DH, Kim YS, Park YS, Bang YJ, Yang HK, Kim SJ (2004) Loss of the Smad3 expression increases susceptibility to tumorigenicity in human gastric cancer. *Oncogene* 23:1333-1341.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S (2005) Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer* 5:51-63.
- Hanoune J, Defer N (2001) Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:145-174.
- Haraguchi M, Okubo T, Miyashita Y, Miyamoto Y, Hayashi M, Crotti TN, McHugh KP, Ozawa M (2008) Snail regulates cell-matrix adhesion by regulation of the expression of integrins and basement membrane proteins. *J Biol Chem* 283:23514-23523.
- Hata A, Shi Y, Massague J (1998) TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* 4:257-262.
- Hirohashi S (1998) Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 153:333-339.
- Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D (2003) Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 147:1-46.
- Howe AK (2004) Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta* 1692:159-174.
- Huber O, Kemler R, Langosch D (1999) Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin. *J Cell Sci* 112 ( Pt 23):4415-4423.
- Iglesias M, Frontelo P, Gamallo C, Quintanilla M (2000) Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent Erk signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas. *Oncogene* 19:4134-4145.
- Ikeguchi M, Taniguchi T, Makino M, Kaibara N (2000) Reduced E-cadherin expression and enlargement of cancer nuclei strongly correlate with hematogenic metastasis in colorectal adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol* 35:839-846.
- Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S (2003) Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* 116:1959-1967.

- Ikura M, Ames JB (2006) Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1159-1164.
- Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, Ueki T, Hirano T, Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, Hayashi N, Hori M (1998) Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 27:951-958.
- Itoh Y, Kimoto K, Imaizumi M, Nakatsuka K (2007) Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of type I collagen induced by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 84:464-472.
- Ivanova K, Lambers B, van den Wijngaard R, Le Poole IC, Grigorieva O, Gerzer R, Das PK (2008) Immortalization of human melanocytes does not alter the de novo properties of nitric oxide to induce cell detachment from extracellular matrix components via cGMP. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44:385-395.
- Jacobowitz O, Iyengar R (1994) Phorbol ester-induced stimulation and phosphorylation of adenylyl cyclase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10630-10634.
- Jacobson DA, Cho J, Landa LR, Jr., Tamarina NA, Roe MW, Buxbaum JD, Philipson LH (2006) Downstream regulatory element antagonistic modulator regulates islet prodynorphin expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E587-E595.
- Jadeski LC, Chakraborty C, Lala PK (2003) Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *Int J Cancer* 106:496-504.
- Jennings MT, Hart CE, Commers PA, Whitlock JA, Martincic D, Maciunas RJ, Moots PL, Shehab TM (1997) Transforming growth factor beta as a potential tumor progression factor among hyperdiploid glioblastoma cultures: evidence for the role of platelet-derived growth factor. *J Neurooncol* 31:233-254.
- Jorda M, Olmeda D, Vinyals A, Valero E, Cubillo E, Llorens A, Cano A, Fabra A (2005) Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci* 118:3371-3385.
- Kajimoto Y, Shirai Y, Mukai H, Kuno T, Tanaka C (1993) Molecular cloning of two additional members of the neural visinin-like Ca(2+)-binding protein gene family. *J Neurochem* 61:1091-1096.
- Kamaraju AK, Roberts AB (2005) Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J Biol Chem* 280:1024-1036.
- Kapp-Barnea Y, Melnikov S, Shefler I, Jeromin A, Sagi-Eisenberg R (2003) Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase beta regulate IgE receptor-triggered exocytosis in cultured mast cells. *J Immunol* 171:5320-5327.
- Karmakar S, Das C (2004) Modulation of ezrin and E-cadherin expression by IL-1beta and TGF-beta1 in human trophoblasts. *J Reprod Immunol* 64:9-29.

- Kasper M, Huber O, Grossmann H, Rudolph B, Trankner C, Muller M (1995) Immunocytochemical distribution of E-cadherin in normal and injured lung tissue of the rat. *Histochem Cell Biol* 104:383-390.
- Kawamura S, Kuwata O, Yamada M, Matsuda S, Hisatomi O, Tokunaga F (1996) Photoreceptor protein s26, a cone homologue of S-modulin in frog retina. *J Biol Chem* 271:21359-21364.
- Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV (1997) Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 390:632-636.
- Kikuchi M, Ma TY, Tarnawski AS, Shimada H, Sarfeh IJ (1997) Role of protein kinase a pathway in epidermal growth factor-induced liver cell repair. *J Gastrointest Surg* 1:132-137.
- Kobayashi M, Masaki T, Hori K, Masuo Y, Miyamoto M, Tsubokawa H, Noguchi H, Nomura M, Takamatsu K (2005) Hippocalcin-deficient mice display a defect in cAMP response element-binding protein activation associated with impaired spatial and associative memory. *Neuroscience* 133:471-484.
- Kooistra MR, Corada M, Dejana E, Bos JL (2005) Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS Lett* 579:4966-4972.
- Koria P, Andreadis ST (2007) KGF promotes integrin alpha5 expression through CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1020-C1031.
- Kotliarova S, Pastorino S, Kovell LC, Kotliarov Y, Song H, Zhang W, Bailey R, Maric D, Zenklusen JC, Lee J, Fine HA (2008) Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. *Cancer Res* 68:6643-6651.
- Krishnan A, Venkataraman V, Fik-Rymarkiewicz E, Duda T, Sharma RK (2004) Structural, biochemical, and functional characterization of the calcium sensor neurocalcin delta in the inner retinal neurons and its linkage with the rod outer segment membrane guanylate cyclase transduction system. *Biochemistry* 43:2708-2723.
- Kuno T, Kajimoto Y, Hashimoto T, Mukai H, Shirai Y, Saheki S, Tanaka C (1992) cDNA cloning of a neural visinin-like Ca(2+)-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 184:1219-1225.
- Lautermilch NJ, Few AP, Scheuer T, Catterall WA (2005) Modulation of CaV2.1 channels by the neuronal calcium-binding protein visinin-like protein-2. *J Neurosci* 25:7062-7070.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW (2006) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172:973-981.
- Lee MY, Chou CY, Tang MJ, Shen MR (2008) Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res* 14:4743-4750.
- Lenz SE, Braunewell KH, Weise C, Nedlina-Chittka A, Gundelfinger ED (1996) The neuronal EF-hand Ca(2+)-binding protein VILIP: interaction with cell membrane and actin-based cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun* 225:1078-1083.

- Lenz SE, Henschel Y, Zopf D, Voss B, Gundelfinger ED (1992) VILIP, a cognate protein of the retinal calcium binding proteins visinin and recoverin, is expressed in the developing chicken brain. *Brain Res Mol Brain Res* 15:133-140.
- Lin L, Jeanclos EM, Treuil M, Braunewell KH, Gundelfinger ED, Anand R (2002a) The calcium sensor protein visinin-like protein-1 modulates the surface expression and agonist sensitivity of the alpha 4beta 2 nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 277:41872-41878.
- Lin L, Jeanclos EM, Treuil M, Braunewell KH, Gundelfinger ED, Anand R (2002b) The calcium sensor protein visinin-like protein-1 modulates the surface expression and agonist sensitivity of the alpha 4beta 2 nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 277:41872-41878.
- Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH (2000) Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 113 ( Pt 20):3563-3571.
- Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, Abbruzzese JL, Hortobagyi GN, Hung MC (2007) Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res* 67:9066-9076.
- Lo ML (2001) A possible role for the WNT-1 pathway in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 12:152-165.
- Lopez-Rodriguez C, Botella L, Corbi AL (1997) CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) regulate the tissue specific activity of the CD11c integrin gene promoter through functional interactions with Sp1 proteins. *J Biol Chem* 272:29120-29126.
- Lopez-Rodriguez C, Nueda A, Rubio M, Corbi AL (1995) Regulation of expression of the LFA-1 and p150,95 leukocyte integrins: involvement of the CD11a and CD11c gene promoters. *Immunobiology* 193:315-321.
- Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T (2003) Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 4:499-515.
- Lustig B, Behrens J (2003) The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 129:199-221.
- Lyle KS, Raaijmakers JH, Bruinsma W, Bos JL, de RJ (2008) cAMP-induced Epac-Rap activation inhibits epithelial cell migration by modulating focal adhesion and leading edge dynamics. *Cell Signal* 20:1104-1116.
- Ma L, Weinberg RA (2008) MicroRNAs in malignant progression. *Cell Cycle* 7:570-572.
- MacNicol MC, MacNicol AM (1999) Nerve growth factor-stimulated B-Raf catalytic activity is refractory to inhibition by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 274:13193-13197.
- Mahloogi H, Gonzalez-Guerrico AM, Lopez De CR, Bassi DE, Goodrow T, Braunewell KH, Klein-Szanto AJ (2003) Overexpression of the calcium sensor visinin-like protein-1 leads to a cAMP-mediated decrease of in vivo and in vitro growth and invasiveness of squamous cell carcinoma cells. *Cancer Res* 63:4997-5004.



- Mammen A, Simpson PJ, Nighorn A, Imanishi Y, Palczewski K, Ronnett GV, Moon C (2004) Hippocalcin in the olfactory epithelium: a mediator of second messenger signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1131-1139.
- Mammone T, Marenus K, Maes D, Lockshin RA (1998) The induction of terminal differentiation markers by the cAMP pathway in human HaCaT keratinocytes. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 11:152-160.
- Manske M, Feindler S, Bade EG (1990) The epidermal growth factor-induced cell migration and expression of the 47,000 Mr secreted glycoprotein EIP-1 of rat liver epithelial cells are down-modulated by cyclic AMP. *Eur J Cell Biol* 52:201-206.
- Matlin KS, Haus B, Zuk A (2003) Integrins in epithelial cell polarity: using antibodies to analyze adhesive function and morphogenesis. *Methods* 30:235-246.
- McCawley LJ, Li S, Benavidez M, Halbleib J, Wattenberg EV, Hudson LG (2000) Elevation of intracellular cAMP inhibits growth factor-mediated matrix metalloproteinase-9 induction and keratinocyte migration. *Mol Pharmacol* 58:145-151.
- McMullan R, Lax S, Robertson VH, Radford DJ, Broad S, Watt FM, Rowles A, Croft DR, Olson MF, Hotchin NA (2003) Keratinocyte differentiation is regulated by the Rho and ROCK signaling pathway. *Curr Biol* 13:2185-2189.
- Melnikova VO, Bar-Eli M (2008) Transcriptional control of the melanoma malignant phenotype. *Cancer Biol Ther* 7:997-1003.
- Miklos GL, Maleszka R (2004) Microarray reality checks in the context of a complex disease. *Nat Biotechnol* 22:615-621.
- Mons N, Cooper DM (1994) Adenylyl cyclase mRNA expression does not reflect the predominant Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated activity in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 6:665-671.
- Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompre AM, Vandecasteele G, Lezoualc'h F (2005) cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* 97:1296-1304.
- Morohashi Y, Hatano N, Ohya S, Takikawa R, Watabiki T, Takasugi N, Imaizumi Y, Tomita T, Iwatsubo T (2002) Molecular cloning and characterization of CALP/KChIP4, a novel EF-hand protein interacting with presenilin 2 and voltage-gated potassium channel subunit Kv4. *J Biol Chem* 277:14965-14975.
- Nagata K, Puls A, Futter C, Aspenstrom P, Schaefer E, Nakata T, Hirokawa N, Hall A (1998) The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *EMBO J* 17:149-158.
- Nakamura M, Nishida T (2003) Potentiation by cyclic AMP of the stimulatory effect of epidermal growth factor on corneal epithelial migration. *Cornea* 22:355-358.
- Natali PG, Nicotra MR, Botti C, Mottotese M, Bigotti A, Segatto O (1992) Changes in expression of alpha 6/beta 4 integrin heterodimer in primary and metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 66:318-322.

- Nef S, Fiumelli H, De CE, Raes MB, Nef P (1995) Identification of neuronal calcium sensor (NCS-1) possibly involved in the regulation of receptor phosphorylation. *J Recept Signal Transduct Res* 15:365-378.
- Nguyen DH, Catling AD, Webb DJ, Sankovic M, Walker LA, Somlyo AV, Weber MJ, Gonias SL (1999) Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol* 146:149-164.
- Nguyen QD, De WO, Bruyneel E, Hendrix A, Xie WZ, Lombet A, Leibl M, Mareel M, Gieseler F, Bracke M, Gespach C (2005) Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment. *Oncogene* 24:8240-8251.
- Nikolakaki E, Coffey PJ, Hemelsoet R, Woodgett JR, Defize LH (1993) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Jun family members in vitro and negatively regulates their transactivating potential in intact cells. *Oncogene* 8:833-840.
- Nyormoi O, Bar-Eli M (2003) Transcriptional regulation of metastasis-related genes in human melanoma. *Clin Exp Metastasis* 20:251-263.
- Ohtaki T, et al. (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-617.
- Ohya S, Horowitz B (2002) Differential transcriptional expression of Ca<sup>2+</sup> BP superfamilies in murine gastrointestinal smooth muscles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G1290-G1297.
- Parmo-Cabanas M, Bartolome RA, Wright N, Hidalgo A, Drager AM, Teixido J (2004) Integrin alpha4beta1 involvement in stromal cell-derived factor-1alpha-promoted myeloma cell transendothelial migration and adhesion: role of cAMP and the actin cytoskeleton in adhesion. *Exp Cell Res* 294:571-580.
- Paterlini M, Revilla V, Grant AL, Wisden W (2000) Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain. *Neuroscience* 99:205-216.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7:415-428.
- Peiro S, Escrivá M, Puig I, Barbera MJ, Dave N, Herranz N, Larriba MJ, Takkunen M, Franci C, Muñoz A, Virtanen I, Baulida J, Garcia De HA (2006) Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res* 34:2077-2084.
- Pignatelli M, Vessey CJ (1994) Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology. *Hum Pathol* 25:849-856.
- Pilewski JM, Latoche JD, Arcasoy SM, Albelda SM (1997) Expression of integrin cell adhesion receptors during human airway epithelial repair in vivo. *Am J Physiol* 273:L256-L263.
- Pilz RB, Casteel DE (2003) Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 93:1034-1046.

- Polans A, Baehr W, Palczewski K (1996) Turned on by Ca<sup>2+</sup>! The physiology and pathology of Ca(2+)-binding proteins in the retina. *Trends Neurosci* 19:547-554.
- Punathil T, Katiyar SK (2009) Inhibition of non-small cell lung cancer cell migration by grape seed proanthocyanidins is mediated through the inhibition of nitric oxide, guanylate cyclase, and ERK1/2. *Mol Carcinog* 48:232-242.
- Pursiheimo JP, Kieksi A, Jalkanen M, Salmivirta M (2002) Protein kinase A balances the growth factor-induced Ras/ERK signaling. *FEBS Lett* 521:157-164.
- Qiao M, Sheng S, Pardee AB (2008) Metastasis and AKT activation. *Cell Cycle* 7:2991-2996.
- Raftopoulou M, Hall A (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265:23-32.
- Ramstad C, Sundvold V, Johansen HK, Lea T (2000) cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating ser-43 of raf-1 in the MAPK/ERK pathway. *Cell Signal* 12:557-563.
- Rashid MG, Sanda MG, Vallorosi CJ, Rios-Doria J, Rubin MA, Day ML (2001) Posttranslational truncation and inactivation of human E-cadherin distinguishes prostate cancer from matched normal prostate. *Cancer Res* 61:489-492.
- Saitoh S, Kobayashi M, Kuroki T, Noguchi T, Takamatsu K (1995) The development of neural visinin-like Ca(2+)-binding protein 2 immunoreactivity in the rat neocortex and hippocampus. *Neurosci Res* 23:383-388.
- Sands WA, Palmer TM (2008) Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal* 20:460-466.
- Santibanez JF, Olivares D, Guerrero J, Martinez J (2003) Cyclic AMP inhibits TGFbeta1-induced cell-scattering and invasiveness in murine-transformed keratinocytes. *Int J Cancer* 107:715-720.
- Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT (1995) Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* 130:1181-1187.
- Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV (1997) Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 236:54-58.
- Schnurra I, Bernstein HG, Riederer P, Braunevel KH (2001) The neuronal calcium sensor protein VILIP-1 is associated with amyloid plaques and extracellular tangles in Alzheimer's disease and promotes cell death and tau phosphorylation in vitro: a link between calcium sensors and Alzheimer's disease? *Neurobiol Dis* 8:900-909.
- Sheppard D (2003) Functions of pulmonary epithelial integrins: from development to disease. *Physiol Rev* 83:673-686.
- Simpson K, McGrath M, Curtis A (1993) Breaking the adhesions of a cell with its substratum. *Cell Biol Int* 17:341-348.

- Sippy T, Cruz-Martin A, Jeromin A, Schweizer FE (2003) Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat Neurosci* 6:1031-1038.
- Smith SC, Theodorescu D (2009) Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins. *Nat Rev Cancer* 9:253-264.
- Specht MC, Barden CB, Fahey TJ, III (2001) p44/p42-MAP kinase expression in papillary thyroid carcinomas. *Surgery* 130:936-940.
- Spilker C, Braunewell KH (2003) Calcium-myristoyl switch, subcellular localization, and calcium-dependent translocation of the neuronal calcium sensor protein VILIP-3, and comparison with VILIP-1 in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 24:766-778.
- Spilker C, Dresbach T, Braunewell KH (2002a) Reversible translocation and activity-dependent localization of the calcium-myristoyl switch protein VILIP-1 to different membrane compartments in living hippocampal neurons. *J Neurosci* 22:7331-7339.
- Spilker C, Gundelfinger ED, Braunewell KH (1997) Calcium- and myristoyl-dependent subcellular localization of the neuronal calcium-binding protein VILIP in transfected PC12 cells. *Neurosci Lett* 225:126-128.
- Spilker C, Gundelfinger ED, Braunewell KH (2002b) Evidence for different functional properties of the neuronal calcium sensor proteins VILIP-1 and VILIP-3: from subcellular localization to cellular function. *Biochim Biophys Acta* 1600:118-127.
- Spilker C, Richter K, Smalla KH, Manahan-Vaughan D, Gundelfinger ED, Braunewell KH (2000) The neuronal EF-hand calcium-binding protein visinin-like protein-3 is expressed in cerebellar Purkinje cells and shows a calcium-dependent membrane association. *Neuroscience* 96:121-129.
- Sporn MB (1997) The war on cancer: a review. *Ann N Y Acad Sci* 833:137-146.
- Su Q, Eugster HP, Ryffel B, Dumont FJ (1996) Cyclosporin A enhances the calcium-dependent induction of AP-1 complex and c-fos mRNA in a T cell lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun* 229:249-256.
- Sunahara RK, Taussig R (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* 2:168-184.
- Swart GW, van Groningen JJ, van RF, Bergers M, Schalkwijk J (1997) Transcription factor C/EBPalpha: novel sites of expression and cloning of the human gene. *Biol Chem* 378:373-379.
- Takahashi H, Honma M, Miyauchi Y, Nakamura S, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H (2004) Cyclic AMP differentially regulates cell proliferation of normal human keratinocytes through ERK activation depending on the expression pattern of B-Raf. *Arch Dermatol Res* 296:74-82.
- Takkunen M, Grenman R, Hukkanen M, Korhonen M, Garcia De HA, Virtanen I (2006) Snail-dependent and -independent epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma cells. *J Histochem Cytochem* 54:1263-1275.

- Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massague J (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451:147-152.
- Thiery JP, Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131-142.
- Thomson AW, Lu L, Subbotin V, Li Y, Noyola H, Qian S, Rao AS, Demetris AJ, Starzl TE (1994) Propagation of dendritic cell progenitors from mouse liver and their in vivo migration to T-dependent areas of allogeneic lymphoid tissue. *Transplant Proc* 26:3484-3486.
- Tian M, Schiemann WP (2009) The TGF-beta paradox in human cancer: an update. *Future Oncol* 5:259-271.
- Varner JA, Cheresch DA (1996) Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 8:724-730.
- Vercauteren FG, Flores G, Ma W, Chabot JG, Geenen L, Clerens S, Fazel A, Bergeron JJ, Srivastava LK, Arckens L, Quirion R (2007) An organelle proteomic method to study neurotransmission-related proteins, applied to a neurodevelopmental model of schizophrenia. *Proteomics* 7:3569-3579.
- Viala E, Pouyssegur J (2004) Regulation of tumor cell motility by ERK mitogen-activated protein kinases. *Ann N Y Acad Sci* 1030:208-218.
- von SM, Marshall JF, Perry P, Stone M, Zhu AJ, Hart IR (2000) Functional interaction between E-cadherin and alpha-v-containing integrins in carcinoma cells. *J Cell Sci* 113 ( Pt 3):425-437.
- Wang Z, Yang H, Zhang F, Pan Z, Capo-Aponte J, Reinach PS (2009) Suppression of GSK-3 activation prolongs Erk1/2 phosphorylation and augments EGF-induced migration in HCEC. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Watt FM (2002) Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J* 21:3919-3926.
- Weeks BH, He W, Olson KL, Wang XJ (2001) Inducible expression of transforming growth factor beta1 in papillomas causes rapid metastasis. *Cancer Res* 61:7435-7443.
- Wells A (2000) Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* 78:31-101.
- Wickborn C, Klein-Szanto AJ, Schlag PM, Braunewell KH (2006) Correlation of visinin-like protein-1 expression with clinicopathological features in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mol Carcinog* 45:572-581.
- Woodgett JR (2001) Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE* 2001:RE12.
- Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL (2004) Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* 6:603-610.
- Xie Y, Chan H, Fan J, Chen Y, Young J, Li W, Miao X, Yuan Z, Wang H, Tam PK, Ren Y (2007) Involvement of visinin-like protein-1 (VSNL-1) in regulating proliferative and invasive properties of neuroblastoma. *Carcinogenesis* 28:2122-2130.

Xu J, Lamouille S, Derynck R (2009) TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 19:156-172.

Yan SZ, Huang ZH, Andrews RK, Tang WJ (1998) Conversion of forskolin-insensitive to forskolin-sensitive (mouse-type IX) adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 53:182-187.

Yan W, Fu Y, Tian D, Liao J, Liu M, Wang B, Xia L, Zhu Q, Luo M (2009) PI3 kinase/Akt signaling mediates epithelial-mesenchymal transition in hypoxic hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 382:631-636.

Ye J, Xu RH, Taylor-Papadimitriou J, Pitha PM (1996) Sp1 binding plays a critical role in Erb-B2- and v-ras-mediated downregulation of alpha2-integrin expression in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 16:6178-6189.

Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hoteiya T, Ueda N, Fujimoto R, Nagayama M (2001) Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol* 37:65-71.

Zhao C, Braunewell KH (2008) Expression of the neuronal calcium sensor visinin-like protein-1 in the rat hippocampus. *Neuroscience* 153:1202-1212.

Zhao CJ, Noack C, Brackmann M, Gloveli T, Maelicke A, Heinemann U, Anand R, Braunewell KH (2009) Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor VILIP-1 leads to the upregulation of functional alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 40:280-292.

Zhu S, Yoon K, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC (2002) CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:207-212.

Zutter MM, Ryan EE, Painter AD (1997) Binding of phosphorylated Sp1 protein to tandem Sp1 binding sites regulates alpha2 integrin gene core promoter activity. *Blood* 90:678-689.

## 7 Verzeichnis der erfolgten Publikationen

### *Originalarbeiten:*

#### (equal contribution)

- **Schönrath K**, Klein-Szanto AJ, Braunewell KH. Reduced cell adhesion and migration in skin squamous cell carcinoma expressing the tumor invasion suppressor VILIP-1 is correlated with cAMP- but not cGMP-signaling. *Submitted.*
- Fidzinski P, Buck N, **Schoenrath K**, Braunewell KH, Meencke HJ, Lehmann TN, Wozny C, Behr J. Downregulation of adenylyl cyclase type 1 causes loss of long-term potentiation in temporal lobe epilepsy. *Submitted.*
- **Schönrath K**, Richter F, Dwary A, Trappe K, Pan W, Braunewell KH. The Neuronal Calcium Sensor Protein VILIP-1 as modulator of cAMP levels and differentiation in Rat Hippocampal Neurons. *In preparation.*
- **Schönrath K**, Klein-Szanto AJ, Braunewell KH. Implication of neuronal calcium sensor VILIP- in the epithelial-mesenchymal transition of skin squamous carcinoma. *In preparation.*
- Kuhla B, Boeck K, Schmidt A, Ogunlade V, Arendt T, Munch G, Luth HJ. Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging. Epub 2006 Jan 18.*
- Kuhla B, Luth HJ, Haferburg D, **Boeck K**, Arendt T, Munch G. Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci. 2005 Jun;1043:211-6.*
- Kuhla B, Boeck K, Luth HJ, Schmidt A, Weigle B, Schmitz M, Ogunlade V, Munch G, Arendt T. Age-dependent changes of glyoxalase I expression in human brain. *Neurobiol Aging. 2006 Jun;27(6):815-22. Epub 2005 Jun.*

### *Poster/ Abstracts:*

- **Schönrath K**, Richter F, Dwary A, Trappe K, Pan W, Braunewell KH. The Neuronal Calcium Sensor Protein VILIP-1 as modulator of cAMP levels and differentiation in Rat Hippocampal Neurons. Graduate Training Programm: learning and memory, DFG Berichtskolloqium GRK 1123. 26.02.2009 Berlin.
- Kuhla B, Boeck K, Munch G, Arendt T, Luth HJ. Glyoxalase I in Aging and Alzheimer's Disease brain. Studiengruppe Neurochemie, Jahrestagung: Molecular mechanisms of neurodegeneration and neuroprotection. 9.-11.09.2004 Leipzig

## **8 Lebenslauf**

Die elektronische Version enthält aus Gründen des Datenschutzes keinen Lebenslauf.

Berlin den 14.06.09



## 9 Anhang

### AliBaba2.1 predicts the following sites in your sequence

#### Sequence *VILIP-1*, 600 bp upstream

```

=====
seq( 0.. 59)
tttgtagtcttataactaaaagcacctagtctcacctgtctttaaacttagcctaagtccc
Segments:
2.1.2.1    28   37                               =RAR-alpha=
1.2.1.0    32   41                               =====E47===
1.2.2.0    32   41                               =====MyoD===
2.3.1.0    51   60
=====Sp1=====                               E-Box-consensus
=====
seq( 60.. 119)
cggaacacgcccgcataataaacattcctccccccaccgcattatccccaaaagatcccctat
Segments:
2.3.1.0    51   60   =
4.5.1.0    70   81                               =====TBP=====
2.3.1.0    81   94                               =====Sp1=====
2.3.3.0    84   93                               =====MIG1=====
2.3.1.0    88   97                               =====Sp1=====
9.9.539    101  110                               =====NF-1=====
=====
seq( 120.. 179)
gaaccagcagcacattccgaccactaacgttaaccaaggcaactgtcaccatgcattta
Segments:
3.1.2.2    120  129   ===Oct-1===
3.6.1.0    130  139   =====TEC1=====
2.3.1.0    135  145   =====Sp1=====
3.1.2.2    170  179
=====Oct-1=====
=====
seq( 180.. 239)
gtcgcattctatgcaaagcaaaatacgtgacaagaaccaaagcatctctggataatcggct
Segments:
3.1.2.1    184  193   ===Pit-1===
3.1.2.2    186  198   =====Oct-1=====
1.1.3.0    194  203   =C/EBPalp=
=====
seq( 240.. 299)
gcgctacacatgcaaaaaaatgcaatgaagattatatttttcacttacagttatagcgct
Segments:
1.1.3.0    249  259   =C/EBPalp=
3.1.2.2    249  263   =====Oct-1=====
3.3.2.0    250  259   ===HNF-3===
2.3.2.2    251  260   ===LyF-1===
3.1.2.1    254  263   ===Pit-1a=
2.3.1.0    255  264   =====Sp1=====
2.3.1.0    296  305
=====
=====

```

```

seq( 300.. 359)
gtgcac cgtca ctttaaggaaaatgataaaactcaacagtt ctttcaaaaa atatatatat
Segments:
2.3.1.0      296  305   Sp1===
2.2.1.1      316  325           ===GATA-1=
3.1.1.2      318  327           ====Ubx===
2.4.1.0      329  338           ====GAL4==
4.6.1.0      338  347           ====SRY===
1.1.3.0      339  348           =C/EBPalp=
4.5.1.0      350  359
====TBP===
3.1.2.2      356  365           ½ CRE-site
=====
seq( 360.. 419)
ttaattcaggctaaccggctaaaccgtctctgcgagtggttctctctcgctccttttctag
Segments:
3.1.2.2      356  365   t-2.1=
=====
seq( 420.. 479)
gagctccgggctgcttaaactctctcttggattgcgccctgcaagcccagcggccgctgca
Segments:
4.5.1.0      430  439           ====TBP===
9.9.539      443  452           ====NF-1==
2.3.1.0      452  461           ====Sp1===
9.9.539      459  468           ====NF-1==
2.3.1.0      464  473
====Sp1===
1.6.1.0      465  474           =AP-
2alph=
3.5.1.2      466  475           ====Adf-
1=
=====
seq( 480.. 539)
acacgctcgggtgaatctctgctgc cagattgggaa tcccatagaaaacctagggtcocctg
Segments:
1.1.3.0      505  514           =C/EBPalp=
4.1.1.0      510  519           ===c-Rel==
9.9.590      510  519           =NF-kappaB
=====
seq( 540.. 599)
gagctgctgctgcaagcgcgagcctccacctctctactcctcccgcccccctcgtttct
Segments:
9.9.637      544  553           ===NRF-1==
9.9.1197     544  553           ===NRF-1==
2.3.1.0      555  564           ====Sp1===
2.3.1.0      564  573           ====Sp1===
2.3.1.0      575  587           ====Sp1====
9.9.270      580  589           ====ETF===
2.3.1.0      581  593
====Sp1====

```

47 segments in this sequence identified as potential binding sites

---

47 segments in complete file identified as potential binding sites

**Sequence E-cadherin, 600 bp upstream**

```

=====
seq( 0.. 59) agactgaaacaggaggatggctaagactaagacaattccaggccacactgagttggaaaa
Segments:
2.3.1.0 6 19 =====Sp1=====
2.3.1.0 35 49 =====Sp1=====
2.2.1.1 37 46 ===GATA-1=
1.1.3.0 50 59 =C/EBPbeta
3.5.3.0 54 63 ===ICS
3.3.2.0 56 65 ===H
E-Box-Consensus

```

```

=====
seq( 60.. 119) caaacaacacaaaaagctaccaacaataaaaccgctcgagaaatagctcagtcagta
Segments:
3.5.3.0 54 63 BP==
3.3.2.0 56 65 NF-3==
1.1.3.0 62 71 =C/EBPalp=
2.3.2.2 65 74 =====Hb===
3.3.2.0 78 87 ===HNF-3B=
1.1.3.0 79 91 ==C/EBPalp=
4.4.1.0 91 100 =====E2===
9.9.539 119 128 =

```

```

=====
seq( 120.. 179) aagccaatggcggcaatgcaatccaagaccctcttggtggaagaagagaattgactct
Segments:
9.9.539 119 128 ===NF-1==
9.9.726 127 136 =represso=
2.2.1.1 132 141 ===GATA-1=
3.1.2.2 132 141 ===Oct-1==
2.3.1.0 160 169 =====Sp1=====
1.1.1.5 171 180 =====GCN4=====

```

```

=====
seq( 180.. 239) tgaaggctgtcgtcttatctccacaatcggctctgtggcacgtgcgctttgcgagcacagga
Segments:
1.1.1.5 171 180 =
0.5.1.0 184 193 =E1A 12S =
2.3.3.0 184 193 =CPE bind=
1.1.2.0 185 194 =CREMdel=
2.2.1.1 191 200 ===GATA-1=
1.1.3.0 211 220 =C/EBPbeta

```

```

seq( 240.. 299) tcgcgctctcgcccgcgcacgcaccctcccccatggttaaagtgcatttaaactcct
Segments:
2.3.1.0 247 258 =====Sp1=====
2.3.2.1 248 257 ===Egr-1==
2.3.1.0 262 273 =====Sp1=====
2.3.3.0 265 274 =CPE bind=
1.1.1.6 282 291 ==CRE-BP1=
1.1.2.0 282 291 ===CBP100=
3.1.1.2 286 295 ===Zen-1==
1.1.3.0 299 308 =

```

```

=====
seq( 300.. 359) aagcaacaactcatccaaccaaagaaaataaaacataagaacaaaaacggaaacctta
Segments:
1.1.3.0 299 308 C/EBPalp=
9.9.539 314 323 =====NF-1==
1.1.3.0 321 330 =C/EBPalp=
3.1.2.2 323 335 =====Oct-1=====
9.9.428 325 334 ===ISGF-3=
2.2.1.1 329 338 ===GATA-1=
1.1.3.0 333 342 =C/EBPalp=
3.5.3.0 347 356 ===IRF-1==

```

```

2.2.1.1      358  367      ==
=====
seq( 360.. 419)      gatgatgaataaagtcctttgtaactccatgtctccgtgggtcagagcacagctaggcta
Segments:
2.2.1.1      358  367      =GATA-1=
3.1.1.12     362  371      ===HNF-1==
3.1.2.1      362  371      ===Pit-1a=
1.1.1.2      396  405      ===c-Fos==
=====
seq( 420.. 479)      ggattcgaacgaccgtggaataggaagctgggaagtcttctaaggccgcccatgccac
Segments:
4.1.1.0      447  456      =NF-kappa=
2.3.1.0      463  472      ===Sp1===
2.3.2.3      463  472      ===WT1===
1.6.1.0      468  477      =AP-2alph=

```

```

seq( 480.. 539)      caactacagacaggggtggaggaagttgagggcctgcagttccttggtgcacacctgca
Segments:
2.3.1.0      486  500      =====Sp1=====
9.9.77       491  500      =CACCC-bi=
9.9.1463     497  506      ===MAF===
2.3.1.0      510  519      ===Sp1===
3.5.3.0      515  524      ===NF-EM5=
9.9.539      522  531      ===NF-1==
3.5.1.2      526  535      ===Adf-1==
1.2.1.0      529  538      =====E1=====
1.2.2.0      534  543      ==myoq
=====
seq( 540.. 599)      ggtgcgtcccagccaatcagcggcgccggggcggtgctgcgggctcacctggcggcc
Segments:
1.2.2.0      534  543      enin
2.3.1.0      541  550      ===Sp1===
1.6.1.0      544  553      =AP-2alph=
9.9.539      549  560      =====NF-1=====
9.9.150      551  560      ===CP1===
9.9.173      552  561      ===CTF===
9.9.233      553  562      =====EFI=====
3.5.1.2      558  567      ==Adf-1==
2.3.1.0      560  574      =====Sp1=====
1.6.1.0      562  571      =AP-2alph=
9.9.270      565  574      ===ETF===
2.3.1.0      566  578      =====Sp1=====
1.6.1.0      577  586      =AP-2alph=
2.1.1.4      585  594      =====ER=====
1.2.1.0      587  596      =====E1=====
1.2.2.0      587  596      ===MyoD===

```

69 segments in this sequence identified as potential binding sites

69 segments in complete file identified as potential binding sites

1.1.1 Sequence Integrin  $\alpha 5$ , 600 bp upstream

```

=====
seq( 0.. 59)      caaactccgcctccaactcaagtcctggctcgttccagtcctcggcgccccagttt
Segments:
4.3.2.0      26   35           ====SRF====
2.3.1.0      44   55           ====Sp1====
=====
seq( 60.. 119)   ccagtgggccccctgccgcttcccgcgccaacctcgccactcaccogtccttcccgg
Segments:
2.3.1.0      66   78           ====Sp1====
2.3.1.0      74   83           ====Sp1====
2.3.1.0      80   90           ====Sp1====
9.9.539      85   94           ====NF-1====
2.3.1.0      90   99           ====Sp1====
2.3.1.0     103  115          ====Sp1====
2.3.1.0     112  121          ====Sp1====
=====
seq( 120.. 179)  ccggtaaaactccacggagaagcaaaaaggagccgggggcccggagagcaccgccgg
Segments:
2.3.1.0     112  121           ==
9.9.590     135  144           =NF-kappaB
9.9.539     137  149           ====NF-1====
9.9.535     140  149           ====NF-1====
4.3.2.0     142  151           ====SRF====
9.9.270     151  160           ====ETF====
2.3.1.0     151  165           ====Sp1====
2.1.1.1     165  174           ====GR====
2.3.1.0     173  187           =====
=====
seq( 180.. 239)  ggctccgctctaggttgaagccccaacctggagtggtggcgccacagtagcagcag
Segments:
2.3.1.0     173  187           Sp1=====
2.3.1.0     197  206           ====Sp1====
2.3.1.0     203  212           ====Sp1====
2.3.1.0     214  226           ====Sp1====
3.1.2.2     234  243           ====Sp1====
3.1.2.2     234  243           ====Oct
=====
seq( 240.. 299)  cagaggcagcagcggcggtaggcgtcggggccccagcgcagcagcaccgcgtggagagg
Segments:
3.1.2.2     234  243           -1==
2.3.1.0     248  257           ====Sp1====
2.3.1.0     261  274           ====Sp1====
2.3.1.0     267  279           ====Sp1====
3.5.2.0     278  287           ====Erg-1====
=====
seq( 300.. 359)  agatcgaggcgaccgtggcgtccagctcccatagtgcccgtcttccctgtcctggggc
Segments:
2.3.1.0     319  330           ====Sp1====
4.3.2.0     324  333           ====SRF====
2.3.1.0     337  348           ====Sp1====
9.9.590     344  353           =NF-kappaB
9.9.853     345  354           =T3R-beta1
2.3.1.0     351  360           ====Sp1====
=====
seq( 360.. 419)  caccgaccggagccgcttccctaaacctcccagaggcgaatgactcaacgcggggaggag
Segments:
2.3.1.0     351  360           =
2.3.1.0     361  375           ====Sp1====
2.3.1.0     372  381           ====Sp1====
1.1.3.0     398  407           =C/EBPalpha
9.9.29      398  409           ====AP-1====
1.1.1.1     400  409           ====c-Jun====
1.1.1.2     400  409           ====c-Fos====
2.3.2.3     408  417           ====WT1====
2.3.1.0     408  420           ====Sp1====
3.1.1.12    418  427           ==
=====

```

```

seq( 420.. 479)      ttgccaactcccggctgggcctcccccgccgcgggcccggctggcggggggcat
Segments:
2.3.1.0      408 420      =
3.1.1.12     418 427      =HNF-1==
9.9.535      421 430      =====NF-1==
2.3.1.0      440 450      =====Sp1===
2.3.2.3      441 450      =Tra-1_(s=
2.3.1.0      446 456      =====Sp1===
9.9.561      449 458      ==NF-muE1=
2.3.1.0      452 465      =====Sp1=====
1.6.1        458 467      =AP-2alph=
2.3.1.0      464 476      =====Sp1=====
2.3.2.3      467 476      =====WT1===
9.9.588      473 482      =NF-kap
9.9.590      473 482      =NF-kap
4.1.1.0      474 483      =NF-ka
3.6.1.0      477 486

=====
seq( 480.. 539)      tcctgggtcccgggacgccgagccgcgccccgcacccgaagggcgctggggggccgca
Segments:
9.9.588      473 482      paB
9.9.590      473 482      paB
4.1.1.0      474 483      ppa=
3.6.1.0      477 486      =TEC1==
1.6.1        484 493      =AP-2alph=
2.3.1.0      485 494      =====Sp1===
2.3.1.0      496 509      =====Sp1=====
2.3.1.0      502 514      =====Sp1=====
2.3.1.0      508 518      =====Sp1===
2.3.1.0      521 533      =====Sp1=====
2.3.2.1      522 531      ==Egr-1==
9.9.270      523 532      =====ETF===
2.3.1.0      529 540      =====Sp1===

=====
seq( 540.. 599)      cctctgaacctggctccggcccagctggaggccgggtggtctggcctggctcagactgg
Segments:
2.3.1.0      529 540      =
2.1.2.10     542 551      =====COUP==
2.3.1.0      552 566      =====Sp1=====
1.6.1        553 562      =AP-2alph=
9.9.561      556 565      ==NF-muE1=
2.3.1.0      567 576      =====Sp1===
1.6.1        581 590      =AP-2alph=
2.3.1.0      581 590      =====Sp1=====
9.9.29       584 593      =====AP-1==
2.3.1.0      588 597      =====Sp1===

```

71 segments in this sequence identified as potential binding sites

71 segments in complete file identified as potential binding sites

## 1.1.2 Sequence snail-1, 600 bp upstream

```

=====
seq( 0.. 59)      gttactgattcttaccocgggcctttccocctcgggtgcttcttctcacttctcttaggaagtc
Segments:
2.3.1.0      13   23           =====Sp1=====
3.5.2.0      41   50           =====PU.1=====
2.3.1.0      42   51           =====Sp1=====
3.4.1.0      48   57           =====HSTF=====
=====
seq( 60.. 119)   atagacaccctcccctgtcaggtgaccggttcattgacagtcacagctgtctctccccacc
Segments:
2.3.1.0      65   76           =====Sp1=====
2.1.1.4      76   86           =====ER=====
2.1.2.3      79   88           =T3R-alpha
1.2.2.0      102  111          =====MRF4=====
2.3.1.0      107  119          =====Sp1=====
1.2.1.0      113  122          =====HEB=====
2.3.1.0      113  122          =====Sp1=====
E-Box-Consensus
=====
seq( 120.. 179)  tcctttcatcaaatcacacctcccttagtattcgaatcctctgtttattctgtctgtct
Segments:
1.2.1.0      113  122          ===
2.3.1.0      113  122          ===
3.1.1.12     162  171          =====HNF-1=====
3.3.2.0      162  171          =====SGF-1=====
1.1.3.0      164  173          =C/EBPalp=
2.2.1.1      179  188          =
=====
seq( 180.. 239)  ctctctcccacggccgggaagccatccttgcgtagggcatccctgggtagtggtttgttc
Segments:
2.2.1.1      179  188          ==GATA-1=
2.3.1.0      191  200          =====Sp1=====
9.9.539      195  204          =====NF-1=====
2.3.1.0      238  247          ==
=====
seq( 240.. 299)  agggctgtgtagacagttccaggaaccocctaagcgcgtgcatatcatcgcactttctggc
Segments:
2.3.1.0      238  247          ==Sp1==
2.3.1.0      287  296          =====Sp1=====
2.3.1.0      295  304          =====S=====
1.6.1.0      297  306          =====Sp1=====
=====
seq( 300.. 359)  tcccagcgcccaaaggtcagcagctcgggatgttgcggggcaccgcgctcgtcgtggg
Segments:
2.3.1.0      295  304          Sp1==
1.6.1.0      297  306          =AP-2=
1.1.3.0      301  310          =C/EBPalp=
2.3.1.0      301  310          =====Sp1=====
2.1.2.1      310  319          =RAR-alpha=
2.1.2.3      310  319          =T3R-alpha
2.1.2.11     310  319          =HNF-4alp=
2.1.1.4      311  320          =====ER=====
2.1.2.10     311  320          =====COUP=====
9.9.45       311  320          =====ARP-1=====
1.6.1.0      321  330          =AP-2alph=
2.3.2.1      321  330          ===Egr-1===
1.1.3.0      329  338          =C/EBPalp=
2.3.1.0      333  342          =====Sp1=====
2.3.1.0      340  349          =====Sp1=====
2.3.1.0      352  366          =====S=====
=====
seq( 360.. 419)  gcaggcgcggccaccaggggtcgccgaggagctcgaagccgcgcggtccggtccggga
Segments:
2.3.1.0      352  366          p1=====
2.3.1.0      362  374          =====Sp1=====
2.3.1.0      373  382          =====Sp1=====
1.6.1.0      380  389          =AP-2alph=

```

```

2.3.1.0      382  393      =====Sp1=====
2.3.1.0      400  412      =====Sp1=====
2.3.1.0      414  425      =====S
=====
seq( 420.. 479)      ggagcccaagcggaatctcagcgccacgcggcgaggagccccagcagcccaggcg cacctg
Segments:
2.3.1.0      414  425      p1=====
4.1.1.0      429  438      ===c-Rel==
9.9.590      429  438      =NF-kappaB
2.3.1.0      445  458      =====Sp1=====
2.3.1.0      454  466      =====Sp1=====
1.6.1.0      456  465      ===AP-2==
9.9.539      460  469      ===NF-1==
2.3.1.0      463  472      ===Sp1===
1.2.1.0      474  483      =====E1
=====

```

```

seq( 480.. 539)      ctccggtctcagtctccggccgcgcgcgccagccattggctcagccttgacaaaagggg
Segments:
1.2.1.0      474  483      E1===
2.3.1.0      487  501      =====Sp1=====
2.3.1.0      495  508      =====Sp1=====
2.3.1.0      501  515      =====Sp1=====
9.9.539      507  516      ===NF-1==
9.9.150      513  522      ===CP1===
9.9.173      513  522      ===CTF===
1.1.3.0      515  524      =C/EBPalp=
2.3.1.0      518  527      =====Sp1=====
9.9.150      525  534      =====CP1=====
2.3.1.0      535  546      =====
1.3.1.2      538  547      ==
=====
seq( 540.. 599)      cgtgaccaacagta cgggtcacgccccagccctgggtacttaaggaatttgctgctgcta
Segments:
2.3.1.0      535  546      Sp1=====
1.3.1.2      538  547      ==USF===
2.3.1.0      556  567      =====Sp1=====
1.6.1.0      561  570      =AP-2alph=
2.3.1.0      562  573      =====Sp1=====
2.1.2.2      564  573      ==RXR-beta

```

64 segments in this sequence identified as potential binding sites

64 segments in complete file identified as potential binding sites