

Tiam1/BRCA2-Signaltransduktion: molekulare Grundlagen und funktionelle Relevanz

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Eva Müller
aus Krappitz

Düsseldorf, November 2010

aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Rainer Engers

Koreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung:

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 4 |
| 1.1 Tumorbiologie | 4 |
| 1.2 Invasion und Metastasierung | 5 |
| 1.3 Tiam1 | 10 |
| 1.4 BRCA2..... | 17 |
| 1.5 BRCA1 | 21 |
| 1.6 Eigene Vorarbeiten / Zielsetzung | 23 |
| 2. Material | 25 |
| 2.1 Laborgeräte | 25 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien | 26 |
| 2.3 Chemikalien | 27 |
| 2.4 Software | 27 |
| 2.5 Oligonukleotidprimer..... | 27 |
| 2.6 Vektoren..... | 28 |
| 2.7 Konstrukte..... | 28 |
| 2.8 Bakterienstämme..... | 28 |
| 2.9 Nährmedien für Bakterienkultur..... | 28 |
| 2.10 Antikörper | 29 |
| 2.11 Reagenziensets “Kits” | 29 |
| 2.12 Proteinstandards..... | 30 |
| 2.13 Nährmedien, Antibiotika und Zusätze für die Zellkultur | 30 |
| 2.14 Zelllinien | 31 |
| 2.15 Gewebeproben | 31 |
| 2.16 Puffer und Lösungen für | 31 |
| 2.16.1 Western Blot Analysen..... | 31 |
| 2.16.2 Zellkultur | 33 |
| 2.16.3 Adhäsionsassays | 33 |
| 2.16.4 MTT-Assays | 33 |
| 2.16.5 Gelatin Zymographie..... | 34 |
| 2.16.6 DNA-Gelelektrophorese..... | 34 |
| 3. Methoden..... | 35 |
| 3.1 Molekularbiologische Methoden | 35 |
| 3.1.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen | 35 |
| 3.1.2 Kultivierung von E-Coli-Zellen | 35 |
| 3.1.3 Plasmid-Isolation (Maxiprep)..... | 35 |
| 3.1.4 Quantitäts- und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren..... | 36 |
| 3.1.5 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion | 36 |
| 3.1.6 Quantitative PCR..... | 37 |
| 3.1.7 Aufreinigung der LightCycler PCR-Produkte | 40 |
| 3.1.8 Sequenzierung | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.9 DNA-Gelelektrophorese..... | 40 |
| 3.2 Zellbiologische Methoden | 42 |
| 3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen..... | 42 |
| 3.2.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen..... | 42 |
| 3.2.3 Bestimmung der Zellzahl | 43 |
| 3.2.4 Transfektion von humanen Zellen mit FuGENE 6 | 43 |
| 3.2.5 Zellsynchronisation durch Serumentzug..... | 43 |
| 3.2.6 Adhäsionsassay..... | 44 |
| 3.2.7 Herstellung von konditioniertem Medium | 44 |
| 3.2.8 Matrigel-Invasions-Assay | 45 |
| 3.2.9 Migrationsassay | 46 |
| 3.2.10 Soft-Agar-Assay | 46 |
| 3.2.11 Colony formation assay..... | 47 |
| 3.2.11 Invasionsassay im 3D Kollagengel | 47 |
| 3.2.12 MTT-Assay..... | 47 |
| 3.2.13 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren | 48 |
| 3.2.14 Asservierung und Aufbereitung von Zellkulturüberständen..... | 48 |
| 3.2.15 Gelatin-Zymographie | 49 |
| 3.3 Proteinbiochemische Methoden..... | 50 |
| 3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten | 50 |
| 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration..... | 50 |
| 3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 51 |
| 3.3.4 Western Blot..... | 51 |
| 3.3.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen | 51 |
| 3.3.6 Immunocytochemische Analyse von Proteinexpressionen..... | 52 |
| 4. Ergebnisse | 54 |
| 4.1 Effekt eines „knockdown“ von Tiam1 auf die BRCA2-Expression | 54 |
| 4.2 Überprüfung der am Beispiel humaner Kolonkarzinomzellen nachgewiesenen Tiam1-induzierten Herabregulation der BRCA2-Expression in anderen humanen epithelialen Zellen..... | 55 |
| 4.3 Funktionelle Relevanz der Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA257 | |
| 4.3.1 Effekt auf die Proliferation..... | 57 |
| 4.3.2 Effekt auf die Zell-Substratadhäsion..... | 59 |
| 4.3.3 Effekt auf die Zell-Migration | 60 |
| 4.3.4 Effekt auf die Matrigelinvasion..... | 61 |
| 4.3.5 Effekte im Soft-Agar-Assay..... | 62 |
| 4.3.6 Effekte im colony formation assay..... | 63 |
| 4.3.7 Effekte auf die Zellmorphologie und das Wachstumsmuster | 64 |
| 4.3.8 Effekte auf die Expression von β -Catenin | 69 |
| 4.3.9 Effekte auf das „membrane ruffling“ | 71 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.10 Effekte auf die Invasion im 3D Kollagenassay | 73 |
| 4.3.11 Effekte auf die Sekretion invasionsrelevanter Proteine | 76 |
| 4.4 Wie wird die Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 vermittelt | 79 |
| 4.5 Lässt sich die in der Zellkultur nachgewiesene inverse Beziehung zwischen der Expression von Tiam1 und der Expression von BRCA2 in vivo überprüfen? | 87 |
| 4.6 Hat Tiam1 auch ein Einfluss auf die Expression von BRCA1? | 89 |
| 4.7 Welche funktionelle Relevanz hat die Tiam1-BRCA2 Signaltransduktion für die DNA-Doppelstrangbruchreparatur?..... | 95 |
| 5. Diskussion..... | 97 |
| BRCA2-Expression in verschiedenen transfizierten humanen epithelialen Zellen . | 97 |
| Funktionelle Relevanz der Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA2 | 98 |
| Molekulare Grundlagen der Herabregulation von BRCA2 | 104 |
| <i>In vivo</i> Korrelation von Tiam1 und BRCA2..... | 108 |
| Einfluss von Tiam1 auf die Expression von BRCA1 | 108 |
| Funktionelle Relevanz der Tiam1-BRCA2 (-BRCA1) Signaltransduktion für die DNA-Doppelstrangbruchreparatur | 111 |
| 6. Zusammenfassung..... | 114 |
| 7. Abstract | 116 |
| 8. Literatur | 118 |
| 9. Anhang | 130 |
| 9.1 Abkürzungsverzeichnis..... | 130 |
| 9.2 Erklärung..... | 133 |
| 9.3 Danksagung..... | 134 |

1. Einleitung

1.1 Tumorbilogie

Nach Herz-Kreislaufkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in westlichen Industrieländern. Dabei geht die Bezeichnung Krebs auf den griechischen Arzt Hippokrates zurück, der unheilbare Knoten und Geschwüre mit diesem Begriff beschrieb. Man kann zwei Tumorarten voneinander unterscheiden, so wachsen benigne (gutartige) Tumore im Gegensatz zu malignen (bösartigen) Tumoren lokal begrenzt und können nicht in das benachbarte Gewebe einwachsen. Die genaue Anzahl molekulargenetischer Veränderungen, die zur Ausbildung eines malignen Tumors benötigt werden, ist bislang noch ungeklärt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Krebsentstehung ein mehrstufiger Prozess ist, der sich aus Initiation, Promotion und Progression zusammen setzt (129). Alle Tumore haben den Verlust von bestimmten Kontrollmechanismen gemeinsam, wodurch eine unkontrollierte und unbegrenzte Zellproliferation ermöglicht wird. Die Ursache hierfür ist meist eine Veränderung von Genen (Mutation), welche in die physiologische Regulation verschiedener Zellprozesse wie der Proliferation, Differenzierung und Apoptose eingebunden sind. In diesem Zusammenhang spielt vor allem die unkontrollierte Aktivierung von Onkogenen und / oder der Verlust bzw. die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen eine entscheidende Rolle (128). Zu den Proto-Onkogenen gehören im wesentlichen Gene, die die Funktion besitzen, Zellproliferation zu stimulieren bzw. zu induzieren. Durch eine Mutation wird aus einem Proto-Onkogen ein Onkogen, wodurch die Tumorentstehung und Progression gefördert wird (132). Dem gegenüber stehen die Tumorsuppressorgene, welche als Gegenspieler der Onkogene fungieren und eine eher hemmende Funktion ausüben. Die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene erfolgt in zwei Schritten (133). Zunächst wird eine Genkopie des Tumorsuppressorgens entweder durch eine Keimbahnmutation oder durch eine sporadische Mutation inaktiviert. Da sie rezessiv sind, reicht dies jedoch allein nicht aus, um das Tumorsuppressorgen vollständig zu inaktivieren. Erst der zusätzliche Verlust des zweiten Allels (loss of heterozygosity) führt dann zur vollständigen Inaktivierung des Tumorsuppressorgens.

1.2 Invasion und Metastasierung

Maligne Tumoren besitzen die Fähigkeit, Metastasen auszubilden. Dabei ist die Metastasierung ein komplexer und dynamischer Prozess, bei dem die Tumorzellen in der Lage sein müssen, eine Reihe von Interaktionen sowohl untereinander als auch mit dem Wirtsgewebe einzugehen. Der Vorgang der Metastasierung lässt sich in verschiedene aufeinander folgende Schritte unterteilen, wobei die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen bislang nur teilweise bekannt sind (77,78). In der Abbildung 1.1.1 ist der Prozess der Metastasierung zur Veranschaulichung am Beispiel von malignen Brustkrebszellen dargestellt.

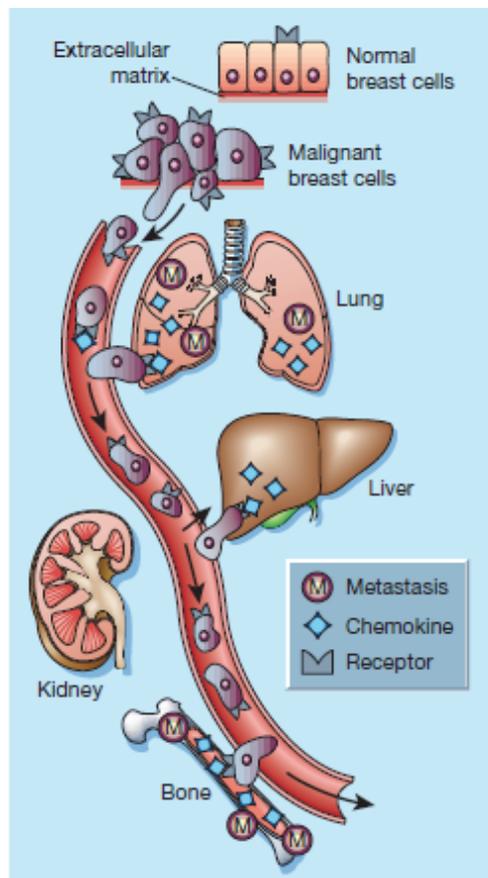


Abbildung 1.1.1: Ablauf der Metastasierung am Beispiel maligner Brustkarzinomzellen. Maligne Brustkarzinomzellen invadieren zunächst die extrazelluläre Matrix und anschließend das Blut- und Lymphsystem. Diese Zellen exprimieren bestimmte Oberflächenrezeptoren viel stärker als normale Brustzellen. Auf ihrem Weg im Blut- und Lymphsystem passieren die Brustkarzinomzellen Organe, welche Chemokine an der Oberfläche exprimieren, die die Oberflächenrezeptoren der Brustkarzinomzellen erkennen. Das wiederum bewirkt, dass die Karzinomzellen das Blut- und Lymphsystem verlassen und das entsprechende Organ invadieren (182).

Im ersten Schritt der Metastasierung lösen sich einzelne Tumorzellen aktiv aus dem Primärtumor, was als Tumorzelldissoziation bezeichnet wird. Anschließend folgt die Invasion der Tumorzellen in das benachbarte Wirtsgewebe und schließlich auch in das Blut- und Lymphsystem (Intravasation). Mit Hilfe der Blut- und Lymphwege gelangen die Tumorzellen dann in andere Zielorgane wo sie zunächst arretieren. Im Anschluss folgen die Extravasation und schließlich die Sekundärinvasion des Zielorgans (78). Nicht immer bildet sich nach diesem Verlauf erfolgreich eine Metastase aus. Die meisten extravadierten Tumorzellen sterben ab. Nur ein sehr geringer Teil der extravadierten Tumorzellen (0,01%) ist auch tatsächlich in der Lage, sich erfolgreich zu vermehren und Metastasen auszubilden (81,82). Darüber hinaus können Tumorzellen über viele Jahre hinweg im Zielorgan inaktiv bleiben, und können so einen Ausgangspunkt für so genannte Spätmetastasen schaffen.

Ein Schlüsselereignis in der Entstehung einer Metastase ist der Prozess der Tumordinvasion: Tumorzellen dringen aktiv in das benachbarte Wirtsgewebe ein (79,80). Dabei sind zwei Mechanismen der Tumorzellinvasion bekannt. Man unterscheidet zwischen der Einzelzellinvasion, bei der sich einzelne Zellen aus dem Tumorzellverband lösen und der kollektiven Invasion, bei der Tumorzellen zusammengeschlossen in einem soliden Verband ins umgebende Gewebe einwachsen (183). Der Prozess der Einzelzellinvasion ist recht komplex und lässt sich in verschiedene zellbiologische Schritte gliedern. Dazu gehören die Auflösung der Zelladhäsion zwischen Tumorzellen, eine aktive Zelllokomotion, die Etablierung temporärer Zell-Matrixkontakte und ein regulierter proteolytischer Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) (78).

Molekularbiologisch sind am Prozess der Tumorzell-Dissoziation (Auflösung der Zelladhäsion zwischen Tumorzellen) - dem initialen Prozess der Einzelzellinvasion - zwei Hauptgruppen an Zelladhäsionsmolekülen beteiligt. Zum einen gibt es die Gruppe der Kalzium-unabhängigen Familie der Immunglobulin-Proteine, zum anderen die Kalzium-abhängige Familie der Cadherine. Dem Zelladhäsionsprotein E-Cadherin wird in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle zugeschrieben, da dessen Expression oder Funktion in invasiven Karzinomen oft reduziert ist und dieser Expressionsverlust z. B. auch beim Übergang kolorektaler Adenome in invasive Adenokarzinome eine wichtige Rolle spielt (77,78). E-Cadherin ist ein transmembranes Glycoprotein, das mit einer Größe von 120 kDa auf Zelloberflächen epithelialer Zellen exprimiert wird. Der extrazelluläre Teil von E-Cadherin bindet an E-Cadherine anderer Zellen und verbindet so die Zellen miteinander. Der intrazelluläre

Teil von E-Cadherin bindet an Catenine, die E-Cadherin so mit dem Aktinzytoskelett verbinden. In Abbildung 1.1.2 ist der Aufbau von E-Cadherin schematisch dargestellt.

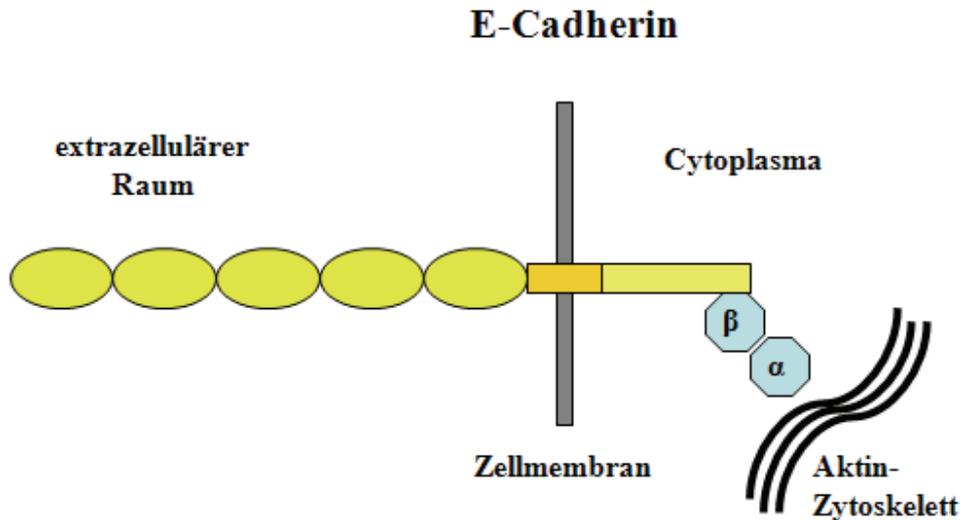


Abbildung 1.1.2: Schematische Darstellung der E-Cadherin-Struktur. Der zytoplasmatische Teil von E-Cadherinen interagiert mit Cateninen, die ihrerseits an das Aktinzytoskelett binden. Der extrazelluläre Teil von E-Cadherin bindet an E-Cadherin-Moleküle anderer Zellen.

Neben der Auflösung der Zelladhäsion müssen Tumorzellen die Fähigkeit besitzen, sich aktiv zu bewegen (aktive Zelllokomotion), um das neue Wirtsgewebe zu invadieren. Die Fortbewegung der Tumorzellen wird durch Ausbildung von Pseudopodien, resultierend aus einer Aktin-Polymerisation am vorderen Zellpol, eingeleitet. Durch anschließende Kontraktion der Zelle und gleichzeitige Auflösung der Adhäsion am hinteren Zellpol kann sich die Zelle schließlich bewegen (100).

Um im weiteren Verlauf der Invasion durch die extrazelluläre Matrix migrieren zu können, müssen die Tumorzellen die Fähigkeit besitzen, temporäre Zell-Matrixkontakte auszubilden. Diese Zell-Kontakte mit der EZM werden durch Substrat-spezifische Oberflächenrezeptoren vermittelt. Hierbei spielt vor allem die Familie der Integrine eine wichtige Rolle. Integrine sind transmembranäre Heterodimäre, die alle aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen und spezifisch an die verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix (Laminin, Fibronectin, Kollagen und Vitronectin) binden (78).

Ein weiterer und letzter Schritt der Invasion ist der proteolytische Abbau der extrazellulären Matrix (EZM). Hierbei spielen die Sekretion und Aktivierung verschiedener Proteasen,

insbesondere der Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMP), eine wichtige Rolle. Innerhalb der Familie der MMPs wird vor allem MMP-2 (72kDa) und MMP-9 (92kDa) bei der proteolytischen Degradation der EZM eine besondere Bedeutung zugeschrieben (101). Die meisten Matrix-Metalloproteinasen werden als latente Proenzyme sekretiert und extrazellulär durch proteolytische Spaltung aktiviert, wobei ihre Aktivität vom Vorhandensein von Kalzium und Zink abhängt (102,103). Matrix-Metalloproteinasen können spezifisch durch so genannte „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMP) gehemmt werden. Bisher konnten 4 Isoformen der TIMP-Proteine identifiziert werden (104). TIMPs können die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 inhibieren, indem sie Komplexe im Verhältnis 1:1 mit den jeweiligen aktiven Formen der MMPs bilden. Darüber hinaus können die TIMPs aber auch Komplexe mit den Pro-MMPs (inaktive Form der MMPs) bilden, wodurch die nachfolgende Aktivierung dieser MMPs verhindert wird. Allerdings ist die Komplexbildung mit den Pro-MMPs wesentlich spezifischer, als die Komplexbildung mit den aktiven MMPs. Dabei bindet TIMP-1 spezifisch an Pro-MMP-9, während TIMP-2 und TIMP-4 spezifisch an Pro-MMP-2 binden. TIMP-3 hingegen ist in der Lage mit beiden Propeptiden dieser MMPs zu interagieren (104-106). Aufgrund ihrer Wirkung werden die TIMPs auch als Suppressorproteine der Invasion und Metastasierung bezeichnet. Untersuchungen zeigen, dass Ungleichheiten in der Expression von Pro-MMPs / MMPs und TIMPs einen invasiven Phänotyp der Zellen induzieren können (107,108).

Während der Prozess der Einzelzellinvasion relativ gut verstanden ist (184), sind die Grundlagen der kollektiven Invasion hingegen noch relativ wenig bekannt (186). Kollektive Invasion findet man vorwiegend in hoch differenzierten epithelialen Tumoren (185). Diese Invasion ist gekennzeichnet durch die gemeinsame, kollektive Bewegung der Zellen, die während des Invasionsprozesses über Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden bleiben (siehe Abbildung 1.1.3) (183).

Sind Tumorzellen einmal auf ein Invasionsmuster festgelegt, müssen sie dieses nicht zwangsläufig beibehalten, denn es gibt auch Hinweise darauf, dass Tumorzellen das Invasionsmuster adaptiv wechseln können (183). Ein etabliertes Verfahren, das kollektive Tumorverhalten *in vitro* zu untersuchen, ist es, dreidimensionale Tumorzellsphäroide in eine dreidimensionale Matrix aus Kollagen, Fibrin oder Matrigel einzubringen (184).

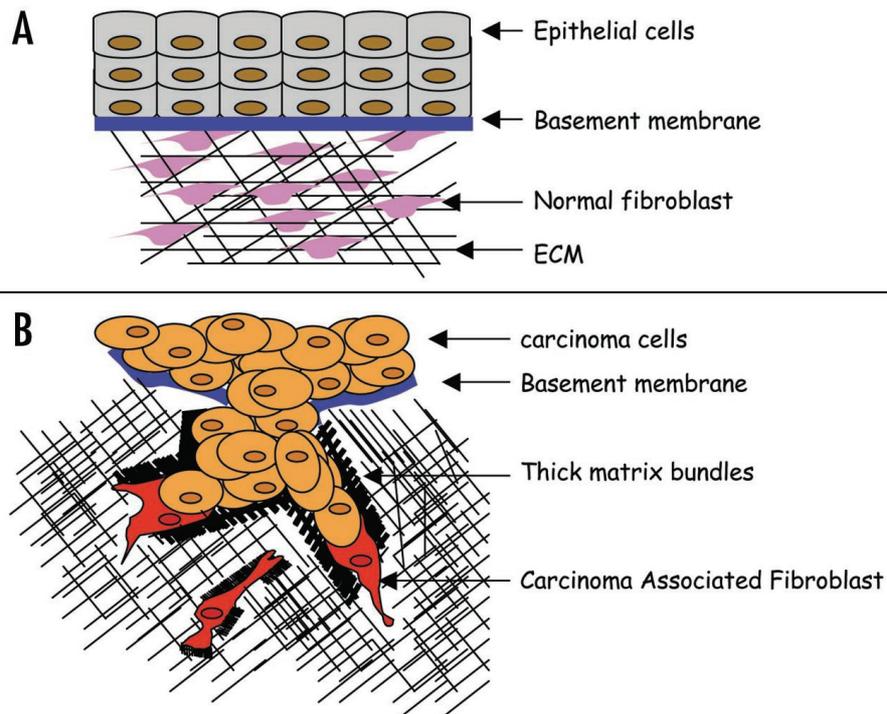


Abbildung 1.1.3: Darstellung der kollektiven Invasion von Tumorzellen. A) Schematische Darstellung eines normalen Epithels. Epithelzellen und Fibroblasten sind hier durch eine Basalmembran voneinander getrennt. Ein Signal-Austausch zwischen beiden Zellarten erfolgt z.B. durch Chemokine. B) Schematische Darstellung der kollektiven Invasion von Tumorzellen. Nachdem die Basalmembran aufgetrennt wurde, bewegen sich die Tumorzellen im Verband. Es existiert keine Trennung mehr zwischen den einzelnen Zelltypen (187).

1.3 Tiam1

Tiam1 wurde als ein Gen entdeckt, das nach N-terminaler Trunkierung in einer murinen T-Lymphomzelllinie Invasion und Metastasierung induziert (1). Strukturell ist das Tiam1-Protein aus 1591 Aminosäuren aufgebaut, woraus sich ein errechnetes Molekulargewicht von 177 kDa ergibt (75). Tiam1 weist mehrere funktionelle Domänen auf (siehe Abbildung 1.3.1), wobei der N-Terminus eine Myristolierungstelle und zwei PEST-Domänen enthält (75). Es wird vermutet, dass PEST-Domänen funktionell für die Degradation von Proteinen verantwortlich sind (75). Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass am N-Terminus des Tiam1-Proteins Inhibitoren binden, da die N-Terminale Trunkierung von Tiam1 zur konstitutiven Aktivierung und Stabilisierung des Proteins führt (76). Dies macht man sich insofern zu Nutze, als dass die meisten Untersuchungen mit einer N-terminal trunkierten, also konstitutiv aktiven Form – bestehend aus den C-terminalen 1199 Aminosäuren – von Tiam1 (C1199-Tiam1) durchgeführt werden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden daher die Untersuchungen mit C1199-Tiam1 durchgeführt.

Weiter 3' von den PEST-Domänen liegt die N-terminale PH-Domäne (PHn), die zusammen mit der flankierenden coiled-coil (CC) –Region und der so genannten Extended (Ex) Region für die Translokation des Proteins an die Plasmamembran verantwortlich ist (75). Die Translokation wird durch die Bindung von Phosphatidylinositol-Lipiden an die PHn-Domäne vermittelt (75). Angrenzend an die PHn-CC-Ex-Domäne findet sich eine Ras-bindende Domäne (RBD), welche die spezifische Bindung von Tiam1 an aktiviertes Ras ermöglicht (75). Daneben folgt eine 95/DlgA/ZO-1 (PDZ) - Domäne, die sich charakteristischerweise in verschiedenen Zytoskelett-Proteinen findet, welche an der Etablierung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind (75,76). Schließlich ist am C-Terminus noch die katalytische Dbl homologe Domäne (DH-Domäne) von Tiam1 lokalisiert, welche gemeinsam mit der angrenzenden C-terminalen PH-Domäne (PHc) für den Nukleotidaustausch verantwortlich ist und Mitglieder der Familie Rho-ähnlicher GTPasen charakterisiert (75,76).

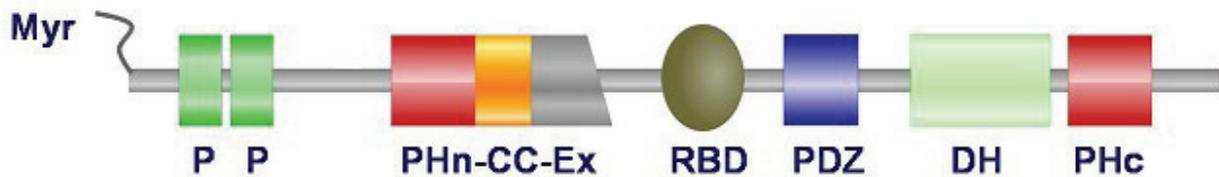


Abbildung 1.3.1: Schematische Darstellung der Tiam1-Struktur. Das Protein enthält verschiedene funktionelle Domänen: myr = Myristoylierungsstelle, P = PEST-Domäne, PHn = N-Terminale PH-Domäne, CC = Coiled-Coil-Region, Ex = zusätzliche flankierende Region, RBD = Ras bindende Domäne, PDZ = PSD-95/DlgA/ZO-1 Domäne, DH = Dbl homologe Domäne, PHc = C-Terminale PH-Domäne.

Biochemisch gehört Tiam1 zur Gruppe der GDP-Dissoziationsstimulatoren (GDS) für Rho-ähnliche GTPasen und aktiviert spezifisch die kleine GTPase Rac (2). Von Rac existieren in Säugerzellen bislang drei hochgradig homologe Isoformen, die auf der Proteinebene eine Sequenzübereinstimmung von etwa 90% aufweisen: das ubiquitär exprimierte Rac1, das spezifisch in hämatopoetischen Zellen exprimierte Rac2 und das bislang am wenigsten gut charakterisierte Rac3 (3).

Tiam1 ist zwar ein Aktivator aller drei Isoformen von Rac (4), doch Untersuchungen zur funktionellen Relevanz des Tiam1/Rac-Signalwegs beziehen sich fast alle auf Rac1. Rac1 ist ein Hauptregulator des Aktinzytoskeletts (5) und darüber hinaus maßgeblich eingebunden in die Regulation der Zell-Zyklus-Progression (6), der Zelladhäsion (7,8), der Migration (9-11), der Invasion (7,10-12) und der Metastasierung (13). Die Tiam1-induzierte Rac1-Aktivierung führt zur Ausbildung von "membrane ruffles", zur Aktivierung der "c-Jun NH₂-terminal Kinase" (JNK) und zur Induktion eines invasiven Phänotyps in einer murinen T-Lymphomzelllinie (2,14,15). Im Gegensatz zu dieser invasionsinduzierenden Funktion führen Tiam1 und Rac1 in epithelialen Zellen zu einer Aktivierung der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion und folglich zu einer Invasionshemmung (7,16-18). In anderen Untersuchungen mit epithelialen Zellen führte die Aktivierung von Rac1 jedoch zu einer Steigerung der Migration und Invasion (9,10,19,20). Diese widersprüchlichen Ergebnisse zur Bedeutung von Tiam1/Rac1 für die Migration und Invasion epithelialer Zellen konnten zumindest teilweise dadurch erklärt werden, dass die Effekte von Tiam1/Rac1 vom Zelltyp, vom verwendeten Zellsubstrat und von der Frage abhängen, ob die Etablierung E-Cadherin-abhängiger Zell-Zellkontakte im Rahmen der jeweiligen Versuchsbedingungen möglich ist oder nicht (9,21). So führte z.B. die Tiam1-vermittelte Rac-Aktivierung in epithelialen MDCK-Zellen zu einer Migrationshemmung, während auf Kollagen I

eine Migrationssteigerung resultierte (9). Außerdem wurde in humanen Keratinozyten gezeigt, dass die Aktivierung von Rac1 zeit- und konzentrationsabhängig zu einer Destabilisierung E-Cadherin-abhängiger Zell-Zellkontakte führen kann, obwohl Rac1 für die Etablierung dieser Kontakte benötigt wird (22). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass insbesondere die intrazelluläre Lokalisation der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Aktivität und die Expression von Komponenten des sogenannten „Par polarity complex“ darüber entscheiden, ob Tiam1 und Rac1 nach ihrer Aktivierung in den Bereich der Lamellipodien transloziert werden und so die Migration stimulieren, oder aber in den Bereich von Zell-Zellkontakten wandern, wo sie deren Etablierung fördern und konsekutiv die Migration von Zellen hemmen (23).

In Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Tiam1 und Rac1 die Matrigelinvasion humaner Nieren- und Kolonkarzinomzellen inhibieren (11). Außerdem konnte mit der selektiven Hochregulation der "tissue inhibitors of metalloproteinases" (TIMP)-1 und TIMP-2 ein neuer molekularer Mechanismus der Tiam1/Rac1-induzierten Invasionshemmung identifiziert werden (11), dessen funktionelle Relevanz belegt und die involvierten Signalwege "downstream" von Rac1 sowie die relevanten TIMP-1-Promotorregionen aufgeklärt werden (12). So erfolgt die Tiam1-induzierte Hochregulation von TIMP-1 auf transkriptioneller, die Hochregulation von TIMP-2 auf posttranskriptioneller Ebene. Die transkriptionelle Hochregulation von TIMP-1 wird dabei über folgende Signalkaskade vermittelt: Tiam1 → Aktivierung von Rac → vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), speziell H_2O_2 → Aktivierung von MEK1,2 → Aktivierung von ERK1,2 → Aktivierung von AP-1 → Bindung von AP-1 an die AP-1-Bindungsstelle (-92/-86) im humanen TIMP-1-Promotor → Aktivierung der TIMP-1 Transkription (12). Da die beschriebenen Effekte von Tiam1 und Rac1 sowohl in humanen Nieren- als auch in humanen Kolonkarzinomzellen nachweisbar waren, handelt es sich nicht um Zelllinien-spezifische Effekte, sondern vielmehr um Effekte bzw. Mechanismen, die offenbar für mehrere Tumorentitäten Gültigkeit besitzen und damit von übergeordneter Bedeutung sein dürften. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass der entdeckte Signalweg auch in Keratinozyten Gültigkeit besitzt und dort zur Hemmung der Apoptose führt (24).

Wie oben ausgeführt, können die Effekte von Tiam1/Rac1 auf die Zellmigration und Invasion in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen bzw. den verwendeten Komponenten der extrazellulären Matrix innerhalb des selben Zellsystems völlig entgegengesetzt - nämlich inhibierend oder stimulierend ausfallen. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen anderer

Gruppen konnte die Arbeitsgruppe inzwischen zeigen, dass die Aktivierung des Tiam1/Rac1-Signalwegs unter entsprechenden Versuchsbedingungen (z.B. Verwendung von Kollagen I statt Laminin oder Matrigel) auch in eigenen Tumormodellen zu einer Steigerung der Migration und Invasion und somit zur Förderung der Tumorprogression führen kann (Engers et al., unveröffentlichte Beobachtung). Neben dieser wichtigen Funktion von Tiam1 und Rac1 für die Regulation der Tumorinvasion und Metastasierung spielen Tiam1 und Rac1 aber auch eine wesentliche Rolle im Rahmen der Onkogenese. So ist schon seit längerem bekannt, dass Rac1 in die Vermittlung der onkogenen Potenz von Ras entscheidend involviert ist (25). Später wurde gezeigt, dass auch Tiam1 in diesen Prozess eingebunden ist. So wird Tiam1 zum einen für die Entstehung (Initiation und Promotion) Ras-induzierter benigner Hauttumoren (Papillome) benötigt (26), zum anderen konnte gezeigt werden, dass Tiam1 ein wichtiges Target des WNT-Signalwegs ist und als solches für die Entstehung intestinaler bzw. kolorektaler Tumoren benötigt wird (27). Neuere Untersuchungen an MMTV-*c-neu* Mäusen zeigen, dass Tiam1 auch in die Entstehung von Mammarkarzinomen eingebunden ist (28).

Außerdem deuten erste Hinweise darauf, dass Tiam1 auch für die Entstehung humaner Prostatakarzinome relevant sein könnte. So konnte mittels semiquantitativer Immunhistochemie gezeigt werden, dass mehr als 95% aller Prostatakarzinome eine signifikant ($p < 0,001$) höhere Tiam1-Expression aufweisen als das korrespondierende Normalgewebe, und eine starke (d.h. $\geq 3,5$ -fache) Überexpression von Tiam1 auch in einer multivariaten Analyse mit einem signifikant ($p = 0,04$) verkürzten rezidivfreien Überleben einhergeht (29). Interessanterweise war diese signifikante Überexpression von Tiam1 aber nicht nur im malignen Tumor, dem Prostatakarzinom, sondern in mehr als 95% der Fälle auch bereits auf der Stufe der präneoplastischen "high grade" prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (HG-PIN) nachweisbar ($p < 0,001$) (29). Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression von Tiam1 als konstantes Phänomen schon früh im Rahmen der Prostatakarzinomentstehung auftritt und somit eine wichtige kausale Rolle in diesem Zusammenhang spielen könnte. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe am Beispiel humaner Nierenzellkarzinome erstmals Tiam1-Mutationen in humanen Tumoren detektieren und für eine dieser Mutationen auch eine onkogene Funktion nachweisen (30).

Im Gegensatz zu Rac1 und Rac3 wird Rac2 spezifisch in hämatopoetischen Zellen exprimiert (3,31), und "knock out" Mäuse für Rac2 sind durch Defekte in verschiedenen hämatopoetischen Zellen charakterisiert (32-36).

Rac3 wird am stärksten im Gehirn exprimiert, konnte aber auch in anderen Organen wie Plazenta, Niere, Pankreas und Herz nachgewiesen werden (37). Im Rahmen eigener Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe erstmals zeigen, dass Rac3 auch in der Prostata und im Prostatakarzinom exprimiert wird. Über die spezifischen Funktionen von Rac3 ist bislang noch wenig bekannt. Die bisher vorliegenden Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass Rac3 nur teilweise ähnliche Funktionen besitzt wie Rac1. So wurde am Beispiel von Ganglioblastomen und Mammakarzinomen gezeigt, dass die Aktivierung von Rac1 und Rac3 jeweils zur Stimulation, die Inaktivierung von Rac1 und Rac3 jeweils zur Hemmung der Invasion führt (38,39). Außerdem besitzt konstitutiv aktives V12-Rac3 - ähnlich wie konstitutiv aktives V12-Rac1 - ein onkogenes Potenzial und ist in der Lage, NIH 3T3 Zellen *in vitro* zu transformieren (40). Hierzu passt auch, dass Rac3 in Mammakarzinomen hyperaktiv ist, und die Inhibition von Rac3 in diesem Tumortyp zur Proliferationshemmung führt (41). Im Gegensatz zu diesen funktionellen Übereinstimmungen zwischen Rac1 und Rac3 gibt es aber auch Hinweise auf funktionelle Unterschiede zwischen beiden Isoformen. So wurde unlängst gezeigt, dass lediglich Rac1, nicht aber Rac3 durch Phosphatidylserin stimuliert und an die Zellmembran transloziert wird (42), was auf unterschiedliche Regulationsmechanismen der Isoenzyme hindeutet. Darüber hinaus sind Rac3 "knock out" Tiere überlebensfähig und weisen keine offensichtlichen Entwicklungsdefekte auf (43), während Rac1 "knock out" Tiere die Embryogenese nicht überleben (44). Außerdem führte die Depletion von Rac1 in Glioblastomzellen zu einer starken Hemmung der Lamellipodienbildung und Migration, während die Depletion von Rac3 in diesen Zellen die Lamellipodienbildung nicht beeinflusste und die Zellmigration nur geringfügig inhibierte (39). Schließlich wurde unlängst am Beispiel neuronaler Zellen gezeigt, dass Rac1 und Rac3 bei der Regulation von Zelladhäsion und Differenzierung entgegengesetzte Effekte aufweisen (45).

Soweit bislang bekannt, sind alle drei Isoformen von Rac in der Lage, die Aktivität verschiedener Signalwege zu beeinflussen. Insbesondere für Rac1 wurde gezeigt, dass es so eine Vielzahl ganz unterschiedlicher zellbiologischer Funktionen regulieren kann. Insgesamt existieren bislang mindestens sechs voneinander unabhängige Signalwege, die sich auf der Ebene von Rac verzweigen (Abbildung 1.3.2) und die durch die Interaktion unterschiedlicher Proteinabschnitte bzw. Aminosäuren (AS) von Rac mit diversen ($n > 15$) Effektormolekülen reguliert werden (12,46-51). Diese Signalwege sind bekanntermaßen alle in der Lage, eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren zu aktivieren und so die Transkription verschiedener Gene zu

beeinflussen. Somit wäre denkbar, dass Rac1, Rac2 und Rac3 über Isoform-spezifische Effektorproteine, Signalwege und Targetgene teils überschneidende, teils divergierende zellbiologische Effekte induzieren. Dies wird gestützt durch die Beobachtung, dass Rac3 im Gegensatz zu Rac1 nur sehr schwach an die bekannten Rac1-Effektoren "mixed lineage kinases" (MLK)-2 und -3 bindet, während im Vergleich zu Rac1 keine Unterschiede in der Bindung an Pak1, Par6 und Phospholipase C- β_2 nachweisbar waren (52).

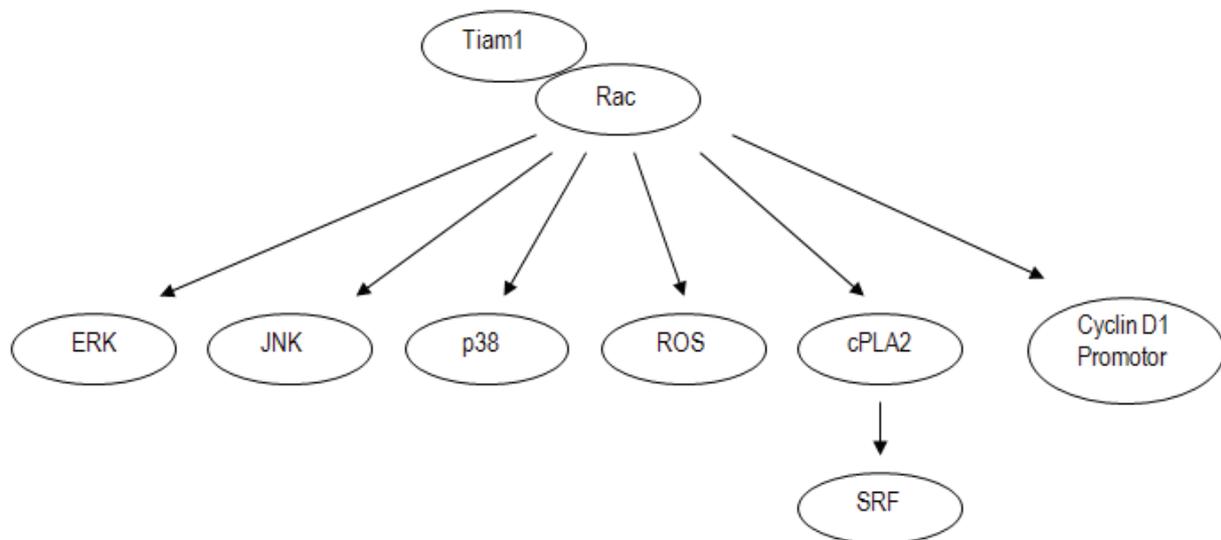


Abbildung 1.3.2: Schematische Darstellung der Signalwege "downstream" von Tiam1/Rac. Insgesamt scheinen mindestens 6 voneinander unabhängige Signalwege "downstream" von Rac zu existieren, die zur Aktivierung des ERK-Pathways, JNK-Pathways, des p38-Pathways, der cytosolischen Phospholipase A₂ (PLA₂) bzw. der Phospholipase C- β_2 (PLC- β_2) mit nachfolgender Aktivierung des "serum response factors" (SRF) und zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen. Außerdem existiert ein weiterer Signalweg, über den Rac den Cyclin D1-Promotor aktiviert.

Trotz dieser vielfältigen grundsätzlichen Möglichkeiten von Tiam1 und Rac, die Transkription von Genen zu beeinflussen, ist bislang noch sehr wenig darüber bekannt, welche Gene konkret durch Tiam1 bzw. Rac transkriptionell reguliert werden und welche funktionellen Konsequenzen sich daraus für Tumorzellen ergeben. Um weitere molekulare Mechanismen der verschiedenen Tiam1-induzierten zellbiologischen Funktionen zu identifizieren, wurden im Rahmen von Voruntersuchungen die Genexpressionsprofile mock- und Tiam1-transfizierter humaner Karzinomzellen mittels cDNA-Microarray verglichen. Im Rahmen dieses Screeningverfahrens und nachgeschalteter weiterer Untersuchungen konnte ein bislang nicht bekanntes „Targetgen“ von Tiam1 identifiziert werden, dessen Expression durch Tiam1 deutlich inhibiert wird und somit

funktionell möglicherweise als Gegenspieler von Tiam1 fungiert. Bei diesem Gen handelt es sich um breast-cancer-associated gene-2 (*BRCA2*). Das Ergebnis der Microarray-Untersuchung konnte anschließend sowohl auf RNA- also auch auf Proteinebene bestätigt werden. Da erste Voruntersuchungen zeigten, dass die Tiam1-induzierte Herabregulation von *BRCA2* funktionell relevant ist, sollte auch eine mögliche *BRCA1*-Tiam1-Korrelation der Expression untersucht werden. Diese Untersuchung war sinnvoll, da *BRCA2* und *BRCA1* funktionell sehr eng verwandt sind und man davon ausgeht, dass die Regulation der Expression beider Proteine möglicherweise über denselben Signalweg verläuft (84).

1.4 BRCA2

BRCA2 (breast cancer 2) wurde – neben BRCA1 - 1995 im Zusammenhang mit der erblich bedingten Entstehung von Brust- und Eierstockkrebs entdeckt und konnte auf Chromosom 13 lokalisiert werden (117). Es gehört zur Klasse der Tumorsuppressorgene, besteht aus 3418 Aminosäuren und gehört somit zu den größten menschlichen Proteinen (53,54). Am C-Terminus befinden sich insgesamt drei für die Kernlokalisierung von BRCA2 verantwortlichen NLS-Sequenzen (55). Darüber hinaus enthält BRCA2 acht so genannte BRC-Motive (kurze Sequenzwiederholungen) die als Bindestelle für Rad51 dienen (siehe Abbildung 1.4.1) (56). Am N-Terminus von BRCA2 befindet sich eine Bindestelle für p300/CBP-associated factor (P/CAF). Aufgrund der Fähigkeit von BRCA2 mit P/CAF zu interagieren, wird BRCA2 die Funktion eines transkriptionellen Regulators zugeschrieben. P/CAF selbst weist eine Histon-Acetylase-Aktivität auf und kann durch Histon-Acetylierung die Transkription verschiedener Gene beeinflussen (118). Zusätzlich zu dieser indirekten Beeinflussung der Transkription über P/CAF besitzt die N-Terminale Region von BRCA2 auch selbst die Fähigkeit direkt die Transkription zu aktivieren, wenn sie an DNA-Bindedomänen gebunden ist.

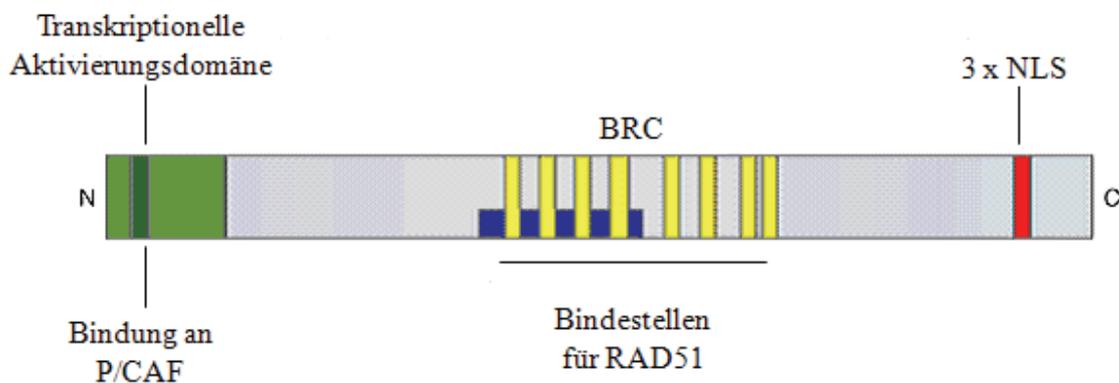


Abbildung 1.4.1: Struktur von BRCA2: C-terminal befindet sich die Kern-Lokalisations-Sequenz (NLS). Darüber hinaus enthält BRCA2 acht BRC-Motive, die als Bindestelle für Rad51 dienen. N-terminal liegt die transkriptionelle Aktivierungsdomäne von BRCA2, da hier auch die Bindestelle für die Histon-Acetylase P/CAF (p300/CBP-associated factor) liegt.

Quelle: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/fig001mgb.gif> ; veröffentlicht in Expert Reviews in Molecular Medicine von Cambridge Universität (2001)

Die Expression von BRCA2 erfolgt zellzyklusspezifisch mit einem Expressionsmaximum in der S-, G2- und M-Phase (53,57). Es gibt zahlreiche Untersuchungen zu Mutationen im BRCA2-Gen, dabei wurde zum Beispiel gezeigt, dass es sich bei BRCA2-assoziierten Brustkarzinomen um überwiegend mittel- oder geringgradig differenzierte duktale Mamakarzinome handelt (58). Mutationen sind insbesondere im Zusammenhang von erblich bedingten Krebsarten von Bedeutung, diesbezüglich lassen sich auch zahlreiche Untersuchungen hierzu finden (53). Neue Untersuchungen zeigen aber auch, dass Mutationen in sporadischen Karzinomen nicht zu vernachlässigen sind, da diese etwa ein Drittel der BRCA1/2 Mutationen in Ovarialkarzinomen ausmachen (172). Untersuchungen zur Funktion von BRCA2 konnten zeigen, dass BRCA2, teilweise überlappend mit BRCA1, eine wichtige Rolle im DNA-Reparatursystem erfüllt. Die korrekte Reparatur beschädigter DNA ist essentiell für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. Dabei unterscheidet man zwei Arten von DNA-Schäden: Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche. Insgesamt ist die Reparatur von Doppelstrangbrüchen kritischer als die von Einzelstrangbrüchen, da hierbei kein komplementärer Strang als Vorlage für die Reparatur zur Verfügung steht (110). Es gibt drei Möglichkeiten, wie solche Doppelstrangbrüche repariert werden können (siehe Abbildung 1.4.2). Zum einen können Doppelstrangbrüche mittels „nonhomologous end joining“ (NHEJ) repariert werden, wobei die freien Enden der DNA-Doppelstränge durch einfache Ligation zusammen gefügt werden. Hierbei besteht immer die Gefahr, dass nach zwei Strangbrüchen die DNA-Stränge möglicherweise falsch zusammen ligiert werden. Zum zweiten können Doppelstränge durch das sogenannte „single-strand annealing“ (SSA) repariert werden. Hierbei werden homologe Sequenzen miteinander gepaart und die Lücken werden anschließend durch DNA-Synthese geschlossen, wobei es auch hier zu Sequenzverlusten kommen kann. Drittens gibt es schließlich die Möglichkeit der „homologous recombination“ (HR), hier dient der homologe Schwesternstrang als Reparaturvorlage für den defekten DNA-Strang. Diese Methode der Doppelstrangbruchreparatur dominiert während der S/G2-Phase des Zellzyklus, wenn Schwesterchromatiden als Reparaturvorlage zugänglich sind, und ist von allen drei Reparaturvarianten am wenigsten fehlerbehaftet (111-113). BRCA2 ist vor allem in den Reparaturweg der homologen Rekombination eingebunden. Die Hauptaufgabe, die BRCA2 in diesem Reparatursystem übernimmt, liegt in der Kontrolle der Rad51-Rekombinase. Rad51 bindet an die BRC-Motive von BRCA2 und infolge dessen bringt BRCA2 Rad51 an den Ort des Doppelstrangbruchs (114,115). Rad51 bildet anschließend lange helikale Filamente aus, die homologe DNA-Doppelstränge miteinander paaren, der Strangaustausch wird eingeleitet und

der Doppelstrangbruch repariert (116). Zellen, bei denen BRCA2 fehlt, oder fehlerhaft ist, sind nicht mehr in der Lage, Doppelstrangbrüche mittels homologer Rekombination zu reparieren. Bei diesen Zellen wird deshalb auf die anderen Doppelstrangbruch-Reparatursysteme zurückgegriffen. Dabei erhöht sich aber insgesamt die Fehlerquote, was schließlich zu einer erhöhten genomischen Instabilität führt (110).

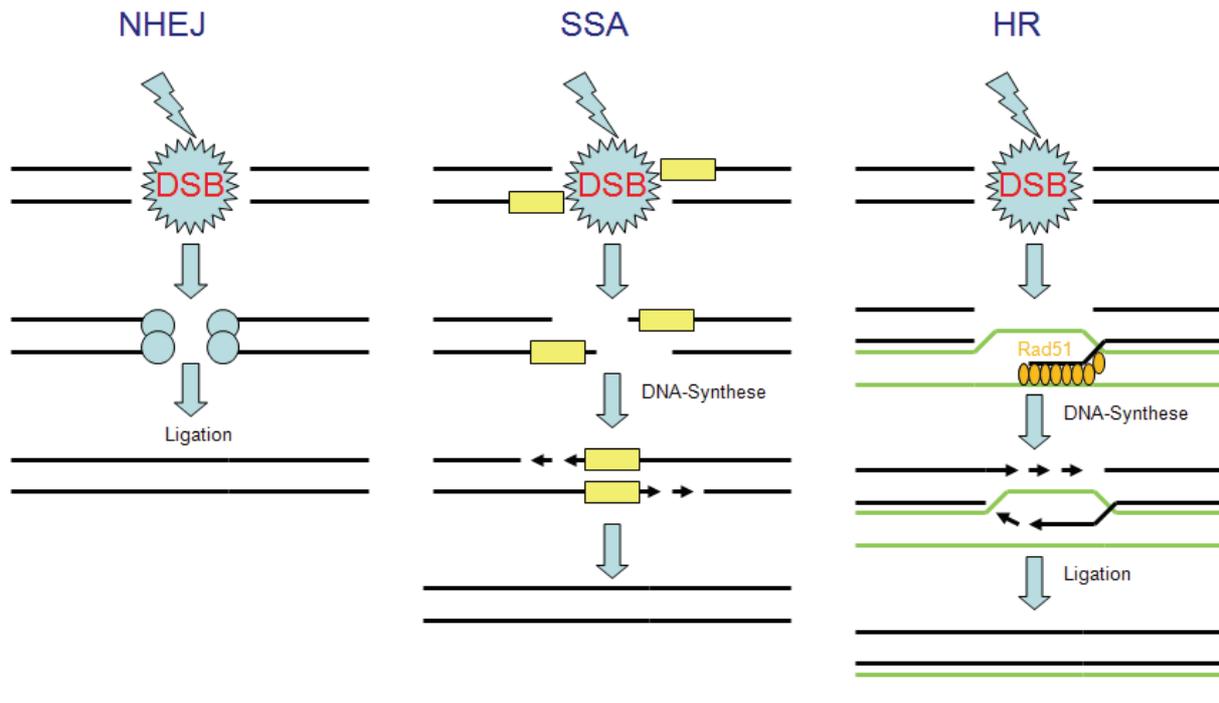


Abbildung 1.4.2: Darstellung der drei Möglichkeiten, Doppelstrangbrüche (DSB) zu reparieren. NHEJ (nonhomologous end joining): die freien Bruch-Enden werden einfach zusammengefügt. SSA (single-strand annealing): hierbei findet eine homologe Paarung statt, allerdings zwischen homologen Sequenzen (gelb markiert) einzelner DNA-Stränge, d. h. ein Strang bildet seine eigene Reparaturvorlage. HR (DNA-Reparatur mittels homologer Reparatur): hier wird der homologe DNA-Doppelstrang als Reparaturvorlage verwendet.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BRCA2 auch in andere wichtige zellbiologische Funktionen involviert ist. So wurde gezeigt, dass BRCA2 die Proliferation von Tumorzellen *in vitro* inhibiert und darüber hinaus auch das Tumorstadium *in vivo* inhibieren kann (59,60). Hier könnte sich ein Zusammenhang zum Tiam1/Rac-Signalweg ergeben, denn die Überexpression von Tiam1 führt nicht nur zu einer Hemmung der BRCA2-Expression, sondern auch zu einer Proliferationssteigerung von Tumorzellen (Engers et al unveröffentlichte Beobachtung). Interessanterweise konnte in einer neueren Untersuchung ein Zusammenhang zwischen BRCA2

und der Tumorinvasion und Migration gezeigt werden. Hiernach hat BRCA2 einen negativen Effekt sowohl auf die Tumorzellinvasion als auch auf die Migration von Tumorzellen (61).

Außerdem konnte in der Studie von Moro et al gezeigt werden, dass ca. 80% der benignen Prostatahyperplasien BRCA2 exprimieren (61). Im Gegensatz dazu konnte in 77% der Prostata-Adenokarzinome entweder eine verminderte oder gar keine BRCA2-Expression detektiert werden (61).

1.5 BRCA1

BRCA1 (breast cancer 1) gehört zur Klasse der Tumorsuppressorgene und besteht aus insgesamt 24 Exons, davon sind zwei nicht kodierend. Zusätzlich zum Voll-Längen-BRCA1 gibt es zahlreiche Spleißvarianten von BRCA1, die gewebespezifisch exprimiert werden (84). Aufgebaut ist BRCA1 aus verschiedenen Domänen (siehe Abbildung 1.5.1). So enthält der N-Terminus eine Ringfingerdomäne, welche für die Vermittlung der BRCA1-BARD1-Proteininteraktionen verantwortlich ist und zudem über eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität verfügt (62,191). Darüber hinaus enthält BRCA1 zwei transkriptionelle Aktivierungsdomänen, wovon sich eine am C-Terminus (TAD) und die andere zentral (AD1) befindet (siehe Abbildung 1.5.1). Beide Aktivierungsdomänen können entweder einzeln oder auch zusammen die Transkription anderer Proteine regulieren (83). Da BRCA1 ein im Kern lokalisiertes Protein ist, enthält es auch zwei für die Kernlokalisierung verantwortliche Sequenzen (NLS).



Abbildung 1.5.1: Struktur von BRCA1: Am N-Terminus befindet sich eine RING-Domäne (RING). Darüber hinaus enthält BRCA1 zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS) und zwei transkriptionelle Aktivierungsdomänen (AD1, TAD). Die transkriptionelle Aktivierungsdomäne TAD enthält Tandem-Sequenzen (BRCT), kurze Sequenzwiederholungen von ca. 95 Aminosäuren. Außerdem enthält BRCA1 am N-Terminus eine Bindesequenz für Proteine der RB1-Proteinfamilie (LXCXE) (83).

Die Expression von BRCA1 variiert während der Zellzyklusprogression und erreicht ihr Maximum in der S-, G2- und M-Phase (63-65). Außerdem konnte auch eine zellzykluspezifische Phosphorylierung von BRCA1 beobachtet werden, was die Bindung an verschiedene Zyklin-abhängige Kinasen fördert (84). Die Funktion von BRCA1 ergibt sich hauptsächlich aus der Bindung an verschiedene Interaktionspartner, so ist BRCA1 an der Bildung von verschiedenen Superkomplexen beteiligt (66,67,191). Bisher konzentrieren sich die Untersuchungen zu BRCA1 auf dessen Funktion im DNA-Reparatursystem und somit auf die Rolle als „genomischer Caretaker“. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass BRCA1 essentiell für die DNA-Reparatur ist, ein Target von verschiedenen DNA-Damage-Signalwegen ist, für einen Arrest an den Zellzykluskontrollpunkten benötigt wird und für eine

einwandfreie Replikation und funktionierende Centromere essentiell ist (68,69,84). Wie schon oben erwähnt, übernimmt BRCA1 darüber hinaus auch die Funktion eines transkriptionellen Regulators, der eine Reihe verschiedener Signalwege reguliert (84). Außerdem konnte gezeigt werden, dass BRCA1 das Wachstum von Tumorzellen beeinflussen kann. So führte eine Überexpression von BRCA1 in Mamma- und Ovarialkarzinomzellen zu einer Hemmung der Proliferation, während ein „knockdown“ von BRCA1 zu einer Steigerung der Proliferation führte (89,120). Darüber hinaus konnte nach Überexpression von BRCA1 in Mama- und Ovarialkarzinomen eine Hemmung der „colony formation“ beobachtet werden (89). Wie BRCA1 selbst reguliert wird, ist noch nicht sehr weit erforscht. Zum einen konnte Id4 als ein potentieller Inhibitor von BRCA1 identifiziert werden (85). Zum anderen kann das aktivierte Tumorsuppressorprotein p53 die Expression von BRCA1 inhibieren, wobei diese Regulation vermutlich über einen negativen „Feedback loop“ verläuft (86,87).

Des Weiteren gibt es zahlreiche Studien zur Bedeutung von Mutationen im BRCA1-Gen. So wurde gezeigt, dass Trägerinnen von BRCA1-Mutationen ein 50-80%iges Risiko haben, bis zum 70sten Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken (70-72). Mutationen im BRCA1-Gen spielen daher wie auch bei BRCA2 hauptsächlich bei hereditärem Brust- und Eierstockkrebs eine wichtige Rolle, Mutationen in sporadischen Karzinomen sind hingegen eher selten (53). Neure Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch sporadische Mutationen nicht zu vernachlässigen sind (172). Wie der Mutationsstatus, so scheint auch die Expressionsstärke von BRCA1 in sporadischen Mamakarzinomen eine große Bedeutung zuzukommen. So konnte gezeigt werden, dass BRCA1 in 30-40% der sporadischen Mamakarzinome eine reduzierte Expression im Vergleich zum Normalgewebe aufweist (88,89). Hier könnte sich ein Zusammenhang zu Tiam1 ergeben, denn erst kürzlich konnte auch eine Signifikanz der Tiam1 Expression in Mamakarzinomen nachgewiesen werden (170).

1.6 Eigene Vorarbeiten / Zielsetzung

Um die molekularen Mechanismen des Tiam1-Rac-Signalwegs aufzuschlüsseln, welcher eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zelladhäsion, Migration, Invasion und Metastasierung spielt, wurden als Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit Expressionsanalysen mithilfe vergleichender cDNA-Microarrays durchgeführt. Bei diesen Expressionsanalysen fanden sich erstmals Hinweise darauf, dass das Tumorsuppressorgen BRCA2 ein Targetgen von Tiam1 ist, dessen Expression durch Tiam1 herab reguliert wird. Das Ergebnis der Microarray-Analyse konnte schließlich am Beispiel der humanen Kolonkarzinomzelllinie DusCol-1B sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene bestätigt werden. Darüber hinaus ist es gelungen, die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 durch retrovirale Co-Transfektion der C1199-Tiam1-exprimierenden DusCol-1B-Zellen mit BRCA2 zu revertieren (siehe Abbildung 1.6.1). Als Kontrolle wurden C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B-Zellen mit dem leeren pCL1-Vektor (C1199-mock) transfiziert.

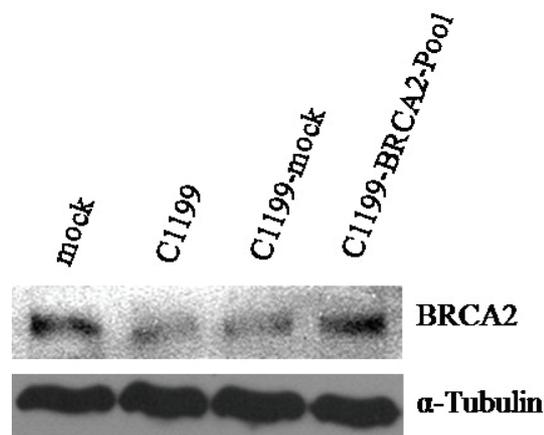


Abbildung 1.6.1: -Expression in verschiedenen transfizierten DusCol-1B Zellen.. DusCol-1B-Zellen wurden entweder mit dem leeren Vektor pLZRS (mock), C1199-Tiam1 im pLZRS Vektor (C1199), C1199-Tiam1 im pLZRS Vektor und dem leeren Vektor pCL1 (C1199-mock) oder mit C1199-Tiam1 im pLZRS Vektor und BRCA2 im pCL1 Vektor (C1199-BRCA2-Pool) transfiziert. Die BRCA2-Expression wurde mittels Western Blot untersucht. Eine gleichmäßige Proteinbeladung der Gele wurde durch Reinkubation der Membran mit α -Tubulin sichergestellt.

Erste Untersuchungen mit diesen stabil transfizierten Zelllinien zeigten, dass die Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 auch tatsächlich von funktioneller Relevanz sein könnte.

Die in den Voruntersuchungen erzielten Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die Bedeutung der Herabregulation von BRCA2 für die Tiam1-induzierten Effekte von großer Bedeutung sein könnte. Diese Untersuchungen sollten deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter vertieft und erweitert werden. Außerdem sollte der molekulare Mechanismus der C1199-Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA2 charakterisiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Lässt sich die inverse Korrelation der Expression von BRCA2 und Tiam1 auch durch einen „knockdown“ von Tiam1 bestätigen?
- Lässt sich die am Beispiel humaner Kolonkarzinomzellen nachgewiesene Tiam1-induzierte Herabregulation der BRCA2-Expression auch in anderen humanen epithelialen Zellen nachweisen?
- Welche funktionelle Relevanz hat die Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2?
- Durch welche Signalwege wird die Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 vermittelt?
- Lässt sich die in der Zellkultur nachgewiesene inverse Beziehung zwischen der Expression von Tiam1 und BRCA2 *in vivo* überprüfen?
- Hat Tiam1 auch einen Einfluss auf die Expression von BRCA1?
- Welche funktionelle Relevanz hat die Tiam1-BRCA2 Signaltransduktion für die DNA-Doppelstrangbruchreparatur?

2. Material

2.1 Laborgeräte

| | |
|------------------------------------|--|
| Analysenwaage | Sartorius AG (Göttingen) |
| Autoklav | Systemec (Wettenberg) |
| Brutschrank | Forma scientific (USA) |
| Elektrophoresekammer | Roth (Karlsruhe) |
| Feinwaage | Sartorius AG (Göttingen) |
| Fluoreszenzmikroskop | Leitz/Leica (Wetzlar) |
| Inkubationsroller RM5 | CAT Zipperer GmbH (Staufen) |
| Inkubationsschüttler 3033 | GFL (Burgwedel) |
| Laser Scanning Immunfluoreszenz | Mikroskop Axiovert 200M Zeiss (Jena) |
| LightCycler | Roche (Mannheim) |
| Magnetrührer MR 3001 | Heidolph (Schwabach) |
| Microplate Reader Model 680 | Biorad (München) |
| Mikroskop Labovert FS | Leitz/Leica (Wetzlar) |
| Wild M3Z | Leitz/Leica (Wetzlar) |
| Mikrowelle Micromat | AEG (Nürnberg) |
| Odyssey Infrared Imaging System | LICOR Biosciences (Bad Homburg) |
| PCR-Gerät, GeneAmp PCR System 2400 | PerkinElmer® (Rodgau-Jügesheim) |
| pH-Meter | HANNA instruments (Padova, Italien) |
| Photometer | Eppendorf (Hamburg) |
| Pipetten | Eppendorf (Hamburg) |
| Spektralphotometer | Eppendorf (Hamburg) |
| Sterilbank Typ DLF/BSS6 | J. H. Schrader (Göttingen) |
| BSB4 | Gelaire Flow Laboratories (Opera, Italien) |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf (Hamburg) |
| Tischautoklav Typ 26 | Melag (Berlin) |
| Ultraschallgerät Sonifier | Bandelin electronics (Berlin) |
| Video Copy Prozessor | Mitsubishi (Ratingen) |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries (Bohemia N.Y., USA) |

| | |
|---------------------------|----------------------------------|
| Wasserbad | Fisher & Rintelen GmbH (Essen) |
| Western Blot Anlage | Hofer (San Francisco) |
| Zentrifugen Megafuge 1,0R | Heraeus Sepatech (Osterode) |
| Universal 16R | Hettich Zentrifugen (Tuttlingen) |
| Biofuge 13R | Hereaus Instruments (Hanau) |
| Mikro 20 | Hettich Zentrifugen (Tuttlingen) |

2.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| Amicon Ultra 10000 | Milipore (Bedford, USA) |
| Deckgläser | Engelbrecht (Edermünde) |
| Reaktionsgefäße (0,5-2ml) | Sarstedt (Nürmbrecht) |
| Falcon Tubes | Greiner (Frickenhausen) |
| Glaspipetten | Roth (Karlsruhe) |
| Halbmikroküvetten UVette | Eppendorf (Hamburg) |
| Hyperfilm ECL | Amersham Bioscience (Freiburg) |
| LightCycler Kapillaren | Biobudget (Krefeld) |
| Nitrozellulosemembran | Whatman GmbH (Dassel) |
| Objektträger | Metzel Gläser (Braunschweig) |
| Parafilm | American National Can TM (Chicago) |
| PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml) | Biozym (Oldendorf) |
| Pipettenspitzen | Sarstedt (Nürmbrecht) |
| Plastikküvetten | Sarstedt (Nürmbrecht) |
| Plastikpipetten | Corning (New York) |
| Sterilfilter | Sartorius /vivascience AG (Hannover) |
| Transwellmembranen | Greiner (Frickenhausen) |
| Whatman Papier | Whatman GmbH (Dassel) |
| Zellkulturflaschen | Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen) |
| Zellkultur Schalen | TPP (Schweiz) |
| Zellsiebe | Falcon (Heidelberg) |

2.3 Chemikalien

Soweit nicht in den Methodenbeschreibungen vermerkt, wurden Chemikalien der Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Roche Molecular Diagnostics (Mannheim), Serva Heidelberg und Sigma (Deisenhofen) verwendet.

2.4 Software

2.4.1 Programme

- SPSS 15.0
- Leica application suite

2.4.2 Datenbanken

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.ensembl.org>
- <http://www.genecards.org>

2.5 Oligonukleotidprimer

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

| | |
|----------------|--------------------------------|
| BRCA1 qPCR fwd | 5'-AGGCAACTTATTGCAGTGTGG-3' |
| BRCA1 qPCR rev | 5'-GCAGAATCCAAACTGATTTTCATC-3' |
| BRCA2 qPCR fwd | 5'-TAGGACTGCTCCCACCAGTT-3' |
| BRCA2 qPCR rev | 5'-GCCTGGGA ACTCTCCTGTTC-3' |
| GAPDH qPCR fwd | 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCA-3' |
| GAPDH qPCR rev | 5'-GGTCATTGATGGCAACAA-3' |

2.6 Vektoren

- pLZRS
- pRS
- pCL1

2.7 Konstrukte

- pLZRS C1199-Tiam1
- pRS sh Tiam1
- pCL1 BRCA2

2.8 Bakterienstämme

- *Escherichia coli* DH5 α F':F'end A1hsdR17rk-mk+supE44thi-1recA1gyrA relA_(lacZYA-argF) U 169 (Φ 80_(lacZ)M15) (Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA)

2.9 Nährmedien für Bakterienkultur

- LB-Flüssigmedium
10 g NaCl
5 g Hefeextrakt
10 g Bacto-Trypton auf 1000 ml H₂O, pH 7,4
nach Bedarf 50 μ g/ml Ampicillin
- LB-Amp-Agar-Platten
10 g NaCl
5 g Hefeextrakt
10 g Bacto-Trypton
10 g Bacto-Agar auf 1000 ml H₂O
50 μ g/ml Ampicillin

2.10 Antikörper

| | | | |
|---------------------------|-----------|--------------------------|---------|
| ➤ anti- α -Tubulin | Maus | Sigma | 1:3000 |
| ➤ anti- β -Catenin | Kaninchen | Sigma | 1:1000 |
| ➤ anti-BRCA1 | Maus | Calbiochem | 1:50 |
| ➤ anti-BRCA2 | Maus | Calbiochem | 1:50 |
| ➤ anti-H2AX | Kaninchen | Cell signaling | 1:1000 |
| ➤ anti-Slug | Kaninchen | Cell signaling | 1:1000 |
| ➤ anti-SKP2 | Kaninchen | Cell signaling | 1:1000 |
| ➤ anti-Parp | Kaninchen | Cell signaling | 1:1000 |
| ➤ anti-Rad51 | Kaninchen | Calbiochem | 1:1000 |
| ➤ anti-Tiam1 (C16) | Kaninchen | Santa Cruz Biotechnology | 1:500 |
| ➤ anti-TIMP-1 | Kaninchen | Acris | 1:500 |
| ➤ anti-TIMP-2 | Kaninchen | Acris | 1:500 |
| ➤ anti-Maus-HRP | Schaf | Sigma | 1:3000 |
| ➤ anti-Kaninchen-HRP | Ziege | Sigma | 1:3000 |
| ➤ anti-Maus-IRDye | Ziege | Licor | 1:10000 |
| ➤ anti-Kaninchen-IRDye | Ziege | Licor | 1:10000 |
| ➤ Fitc-anti-Maus | Ziege | Zymed | 1:60 |
| ➤ Fitc-anti-Kaninchen | Ziege | Zymed | 1:60 |

2.11 Reagenziensets "Kits"

| | |
|-----------------------------|--------|
| ➤ Qiagen RNeasy Mini Kit | Qiagen |
| ➤ Omniscript RT-Kit | Qiagen |
| ➤ QIAprep Spin Maxiprep Kit | Qiagen |
| ➤ Nucleotide Removal Kit | Qiagen |

2.12 Proteinstandards

High Range Marker: BioRad (München)
(Proteine zu 200; 116,25; 97,4; 66,2; 45 kDa)

Low Range Marker BioRad (München)
(Proteine zu 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4 kDa)

Kaleidoscope Prestained Standards BioRad (München)
(Proteine zu 204,2; 130,8; 92,7; 38,4; 31,5; 17,9; 7,3 kDa)

Prestained Protein Ladder Plus Fermentas (St. Leon-Rot)
(Proteine zu 250; 130; 95; 70; 55; 35; 27; 15; 10 kDa)

HiMark™ Pre-Stained Protein Standard Invitrogen (Paisley)
(Proteine zu 460; 268; 238; 171;117; 71;71; 55; 41;31 kDa)

2.13 Nährmedien, Antibiotika und Zusätze für die Zellkultur

| | |
|---|---------------------|
| Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) | Gibco BRL (Paisley) |
| OptiMEM | Gibco BRL (Paisley) |
| RPMI | Gibco BRL (Paisley) |
| Fötales Kälberserum (FCS) | Gibco BRL (Paisley) |
| Geneticin (G418) | Gibco BRL (Paisley) |
| L-Glutamin | Gibco BRL (Paisley) |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung | Gibco BRL (Paisley) |
| nicht essentielle Aminosäuren | Gibco BRL (Paisley) |
| Pyruvat | Gibco BRL (Paisley) |
| Trypsin | Gibco BRL (Paisley) |

2.14 Zelllinien

| Zelllinie | Organ | Kulturmedium | Antibiotika |
|-----------|----------|--------------|-------------|
| BPH-1 | Prostata | RPMI | Pen/Strep |
| DusCol-1B | Colon | DMEM | Pen/Strep |
| LNCaP | Prostata | RPMI | Pen/Strep |
| MCF7 | Brust | RPMI | Pen/Strep |

Tabelle 2.14.1: Verwendete Zelllinien. Übersicht über die verwendeten Zelllinien mit Informationen zum Kulturmedium und dem Organ aus dem sie etabliert wurden.

2.15 Gewebeproben

Die für die Isolation von RNA verwendeten Proben der Prostatakarzinome sowie die Normalgewebe wurden aus dem Archivmaterial des Instituts für Pathologie bereit gestellt.

2.16 Puffer und Lösungen für

2.14.1 Western Blot Analysen

- Lysispuffer :
 - 1 % (w/v) SDS
 - 10 mM Tris-HCl pH 7,5
 - 2 mM EDTA
 - 0,1 % (w/v) NP40

- 2 x SDS Gel-Lade-Puffer:
 - 0,1 M Tris-HCl pH 6,8
 - 0,2 M DTT
 - 4 % (w/v) SDS
 - 20 % (v/v) Glycerol
 - eine Spatelspitze Bromphenolblau

- 6 x SDS Ladepuffer: 60 % (v/v) Glycerol
 300 mM Tris pH6,8
 12 mM EDTA
 12 % (w/v) SDS
 864 mM β-Mercaptoethanol
 0,05 % Bromphenolblau (eine Spatelspitze)

- Trenngel:

| | 4% | 5% | 6% | 8% | 10% | 12% |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Wasser | 5,9 ml | 5,7 ml | 5,3 ml | 4,6 ml | 4 ml | 3,3 ml |
| 30 % Acrylamid | 1,3 ml | 1,6 ml | 2 ml | 2,7 ml | 3,3 ml | 4 ml |
| 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 | 2,5 ml |
| 10 % SDS | 100 µl |
| 10 % APS | 100 µl |
| TEMED | 10 µl |

Tabelle 2.16.1: Komponenten der jeweiligen SDS-Polyacrylamid-Trenngele. Ein Ansatz reicht für ein Gel à 9,5 cm x 9,5 cm

- Sammelgel:

| 5% | 5 ml |
|--------------------|--------|
| Wasser | 3,4 ml |
| 30% Acrylamid | 830 µl |
| 1M Tris-HCl pH 6,8 | 630 µl |
| 10 % SDS | 50 µl |
| 10 % APS | 50 µ |
| TEMED | 5 µl |

Tabelle 2.16.2: Komponenten des Sammelgels für SDS-Polyacrylamid-Gele. Der Ansatz reicht aus für ein Gel der Größe 9,5 cm x 9,5 cm

- 10 x Elektrophorese-puffer: 0,25 M Tris
 2 M Glycerin
 10 % (w/v) SDS

- Transferpuffer: 25 mM Tris
0,2 M Glycin
20 % (v/v) Methanol
- Waschpuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5
0,2 % (v/v) Tween 20
0,15 M NaCl
- Blockierungs-Lösung A: 3 % (w/v) Milchpulver
1 % (w/v) BSA in Waschpuffer
- Blockierungs-Lösung B: 5 % BSA in Waschpuffer
- ECL-Lösung A: 0,1 M Tris pH 8,6
2,5 mM Luminol in DMSO
- ECL-Lösung B: 6,7 mM p-Coumarinsäure in DMSO
- ECL-Lösung C: 3 % H₂O₂

2.16.2 Zellkultur

- EDTA/Trypsin-Lösung 10 % (v/v) Trypsin (10x Stock)
5 % EDTA in PBS

2.16.3 Adhäsionsassays

- 3 % (w/v) BSA in PBS
- Laminin 10µg/ml in PBS

2.16.4 MTT-Assays

- 20 µg MTT in PBS

2.16.5 Gelatin Zymographie

- Färbelösung: 30 % Methanol
10 % Eisessig
0,25 % Coomassie Blau

- Entfärbelösung: 30 % Methanol
10 % Eisessig

- Waschlösung: 2,5 % Triton X100 in Wasser

- Reaktionspuffer: 0,05 M Tris-HCL pH 7,5
0,02 M NaCl
5 mM CaCl₂
0,02 % Brij-35

- 2x Probenpuffer : 0,5 M Tris-HCL pH 6,8
10 % (w/v) SDS
20 % (v/v) Glycerol
Bromphenolblau

2.16.6 DNA-Gelelektrophorese

- 50x TAE-Puffer 2 M Tris
5,7 % (v/v) Eisessig
10 % 0,5 M EDTA pH 8,0

- 6 x Auftragspuffer 30 % Glycerol
0,4 % Orange G
10 mM Tris-HCL pH 7,5
25 mM EDTA

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden zunächst mit dem Lysispuffer homogenisiert, anschließend auf eine RNeasy-Säule pipettiert und zentrifugiert. Nach einem DNase-Verdau und mehreren Waschschritten wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

3.1.2 Kultivierung von E-Coli-Zellen

Die Anzucht der Bakterienstämme erfolgte in LB-Medium bei 37°C auf einem Schüttelinkubator für 16-18 Stunden. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch Zugabe von Ampicillin ($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$) zum Medium. Zum Anlegen von Gefrierkulturen wurden sogenannte Glycerolstocks angefertigt. Hierfür wurden E-Coli-Zellen, die auf einer LB-Agar (Ampicilin)-Platte ausgestrichen worden waren, mit 1ml LB-Medium resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden $500\ \mu\text{l}$ mit $500\ \mu\text{l}$ sterilem Glycerol versetzt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.3 Plasmid-Isolation (Maxiprep)

Die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe des „QIAprep Spin Maxiprep Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden 200ml LB-Medium mit Ampicillin ($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt und mit dem E. Coli-Glycerolstock angeimpft. Dann folgte eine Inkubation der Bakterien über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator. Nach dieser Inkubation erfolgten eine alkalische Lyse der Bakterien und Bindung der Plasmid-DNA an die Säule unter geeigneten Salz- und pH-Konzentrationen. Störende Faktoren wie RNA, Proteine oder andere Verunreinigungen wurden durch Waschen mit Puffern mittlerer Salzkonzentrationen entfernt. Nach der Eluierung der DNA

durch einen Puffer mit hoher Salzkonzentration folgte die Präzipitation mit Insopropanol. Durch Waschen mit 70%igem Ethanol wurde anschließend entsalzt. Zum Schluss wurde die DNA in 200µl dH₂O resuspendiert und bei –20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.4 Quantitäts- und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Plasmid-DNA, genomischer DNA und RNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm im Photometer. Für die Analysen wurde eine Halbmikroküvette der Firma Eppendorf verwendet. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer der Firma Eppendorf. Dabei gibt der Quotient aus E_{260}/E_{280} Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäuren und kann auf mögliche Kontaminationen der Nukleinsäuren hindeuten. Idealerweise sollte der Quotient aus E_{260}/E_{280} zwischen 1,8 und 2 liegen, allerdings kann dieser Quotient auch vom pH-Wert und dem Salzgehalt der RNA-Lösung beeinflusst werden (109).

3.1.5 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Reversen Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) kann RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Durch Auswahl von Oligo-dT-Primern wird nur mRNA (messenger RNA) in cDNA umgeschrieben, da Oligo-dT-Primer mehrere Thymidin-Basen enthalten, die komplementär zum Poly(A)Schwanz am 3'Ende der mRNA sind. Daher wird nur fertig gespleißte und modifizierte mRNA in cDNA umgeschrieben. Für die RT-PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

| Reagenzien | Volumen [µl] |
|--------------------------------|--------------|
| 10x RT-Puffer | 2 |
| dNTPs (10mM) | 2 |
| Oligo-dT-Primer 10pmol | 2 |
| RNase Inhibitor (10 U/µl) | 0,25 |
| Reverse Transkriptase (4 U/µl) | 1 |
| RNA | 1,5µg |
| Wasser | auf 20 |

Tabelle 3.1.5.1: Pipettierschema Mastermix Reverse Transkription

Der RT-PCR-Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C nach Herstellerangaben der Firma Qiagen inkubiert. Anschließend wurde die hergestellte cDNA bei -20°C gelagert.

3.1.6 Quantitative PCR

Eine PCR (polymerase chain reaction) ermöglicht es, kurze bekannte DNA-Fragmente zu vervielfältigen. Dabei wird eine DNA-Polymerase verwendet, die eine DNA-Vorlage in mehreren Zyklen mehrfach kopiert. Zwei Oligonukleotidprimer, die komplementär zum gewünschten DNA-Fragment sind, setzen den Start- und Endpunkt der DNA-Synthese fest, indem sie die DNA-Polymerase zum Startpunkt der DNA-Replikation führen. Für die DNA-Synthese benötigt die DNA-Polymerase Nukleotide, die als Bausteine dienen und geeignete Pufferbedingungen, die eine optimale chemische Umgebung für die Polymerase schaffen. Die PCR beginnt mit einem Denaturierungsprozess, bei dem die DNA-Doppelstränge voneinander getrennt werden. Anschließend folgen 25 bis 50 Zyklen, die jeweils aus den Schritten Denaturierung, Primerhybridisierung (= Annealing) und Elongation bestehen. Die Denaturierung bei 96°C bewirkt die Aufspaltung der Wasserstoffbrücken, die die DNA-Doppelstränge aneinander halten. Im nächsten Schritt (Annealing) lagern sich die Primer an die komplementären DNA-Fragmente an, hierfür wird die Temperatur unter die Schmelztemperatur der verwendeten Primer gesenkt. Im Elongationsschritt synthetisiert die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge unter Verwendung der beigefügten Nukleotide. Die Temperatur, bei der dieser Schritt stattfindet, hängt von der optimalen Temperatur der verwendeten Polymerase ab.

Während die qualitative PCR lediglich eine Endpunktbetrachtung des Produkts erlaubt, ermöglicht die real time PCR mittels LightCycler eine genauere kinetische Quantifizierung, da hierbei Mengenunterschiede während der logarithmisch-linearen Phase der PCR bestimmt werden. Die entstandene Produktmenge wird während jedes PCR-Zyklus gemessen. Zudem lässt sich die Kinetik der Reaktion verfolgen. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, die entstehenden DNA-Amplikate zu verfolgen: Zum einen über ein nicht spezifisches Detektionssystem, welches auf der Markierung der DNA durch interkalierende Farbstoffe beruht, zum anderen über den Einsatz spezifischer fluoreszenzmarkierter Sonden. Beide Möglichkeiten beruhen auf dem Anstieg der Fluoreszenz proportional zum Anstieg der amplifizierten DNA. Diese Proportionalität ermöglicht eine Quantifizierung des Ausgangsmaterials. Als

fluoreszierender Farbstoff wurde in dieser Arbeit SYBR Green™ der Firma Invitrogen verwendet. SYBR Green besitzt eine Anregungswellenlänge von 597nm und eine Emissionswellenlänge von 520nm.

Am Ende jeder LightCycler PCR wird eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, indem die Temperatur schrittweise bis 95°C angehoben und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wird. Die Temperatur, bei der das Produkt schmilzt und der Farbstoff dissoziiert, ist durch einen Abfall der Fluoreszenz gekennzeichnet und wird in der Grafik mit Temperatur auf der X-Achse und Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse als Peak dargestellt. Die Temperatur, bei der sich DNA-Doppelstränge trennen, hängt sehr stark von der Sequenz, der Länge und dem GC-Gehalt der untersuchten DNA ab. Sogar Unterschiede in einzelnen Basenpaaren können eine andere Schmelztemperatur verursachen, daher haben verschiedene Produkte unterschiedliche Peaks und können so voneinander unterschieden werden.

Die Fluoreszenz wird in der Elongationszeit gemessen und der gemessene Wert wird in einer Amplifikationsgrafik auf der Y-Achse gegen die Zyklenzahl auf der X-Achse dargestellt. Am Anfang jeder quantitativen PCR ist eine gewisse Grundfluoreszenz zu beobachten, die durch die eingesetzten Materialien sowie durch den Fluoreszenzfarbstoff verursacht wird. Erst nach einer gewissen Amplifikationszeit steigt die Fluoreszenz über den Schwellenwert der Grundfluoreszenz an und kann dann gemessen werden, was zwischen 3-15 PCR-Zyklen dauern kann. Der Schnittpunkt zwischen zunehmender Fluoreszenz und Schwellenwert wird als Cycle-Threshold (C_T) bezeichnet und wird automatisch für jede Probe durch das Computerprogramm berechnet. Der C_T -Wert erlaubt die Quantifizierung einer Reaktion und verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge.

Die Quantifizierung kann entweder absolut, beruhend auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR-Produkten bekannter Konzentrationen, oder relativ, bezogen auf die Genexpression eines Haushaltgens, erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene cDNAs von Geweben oder Zelllinien mittels LightCycler quantifiziert. Die cDNAs wurden in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Grundsätzlich erfolgte die Quantifizierung immer als Doppelbestimmung, bei fragwürdigen Proben erfolgte aber auch eine Mehrfachbestimmung.

In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung der Genexpression ein auf SYBR Green der Firma Invitrogen basierender Enzymmix und unmarkierte, selbst generierte Primer verwendet. Der Enzymmix wurde nach Herstellerangaben vermischt und setzte sich wie folgt zusammen:

| Reagenzien | Volumen [μ l] |
|-----------------------|--------------------|
| SYBR Green | 10 |
| Primer fwd 10 μ M | 1 |
| Primer rev 10 μ M | 1 |
| BSA | 1 |
| Wasser | 5 |
| Probe 10 ng/ μ l | 2 |

Tabelle 3.1.6.1 Pipettierschema Mastermix für LightCycler Quantifizierung

Die Zielsequenzen folgender Gene wurden unter Verwendung des Mastermix amplifiziert: GAPDH, BRCA2 und BRCA1. Da für die Untersuchungen die Primer so ausgewählt wurden, dass möglichst alle PCR-Produkte ca. 100bp betragen, konnte für alle Zielsequenzen folgendes PCR-Programm mit anschließender Schmelzpunktanalyse verwendet werden:

| | | | |
|-------|-------|---------------|-------|
| 120 s | 95 °C | Denaturierung | } 50x |
| 5 s | 94 °C | Denaturierung | |
| 10 s | | Annealing | |
| 10 s | 72 °C | Elongation | |

Lediglich die Annealing-Temperaturen variierten in Abhängigkeit von den jeweils verwendeten Primern:

| Gen | Annealingtemperatur |
|-------|---------------------|
| BRCA1 | 55 °C |
| BRCA2 | 57 °C |
| GAPDH | 54 °C |

Tabelle 3.1.6.2: genabhängige Variationen in der Annealingtemperatur

Die Quantifizierung der RNA-Expressionslevel von BRCA1 und BRCA2 erfolgte immer relativ und wurde auf die Genexpression von GAPDH normalisiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Softwareprogramm Microsoft Excel.

3.1.7 Aufreinigung der LightCycler PCR-Produkte

Diese Methode dient dazu, die amplifizierte PCR-Produkte von Primern (bis zu einer Größe von 17 Nukleotiden), Enzymen und überschüssigen Nukleotiden zu trennen. Die Aufreinigung erfolgte mittels „Nucleotide Removal Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Nachdem die PCR-Produkte aus den LightCycler-Kapillaren extrahiert worden waren, wurden 200µl PN-Puffer dazugegeben und der gesamte Ansatz auf die Säule pipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 6000rpm für eine Minute, wurde die Säule gewaschen und das PCR-Produkt mit 50µl EB-Puffer aus der Säule eluiert.

3.1.8 Sequenzierung

Die zu sequenzierenden Proben wurden als Auftragsarbeit an die Firma GATC gegeben. Dort wird die Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger unter Verwendung von „Dye Terminatoren“ durchgeführt (121). Die Sequenzier-Reaktion beruht auf einer gezielten, aber statistisch verteilten Unterbrechung der Komplementärstrangsynthese durch den Einbau eines Didesoxynukleotidtriphosphats. Die 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphate sind fluoreszenzmarkiert und bewirken einen Kettenabbruch nach ihrem Einbau, weil sie keine 3'-OH-Gruppe besitzen und dadurch auch keine weiteren 5'-3'-Phosphodiesterbindungen geknüpft werden können. So wird mittels der Sequenzier-PCR eine Reihe basenspezifischer terminierter DNA-Fragmente amplifiziert, die sich in ihrer Länge um jeweils eine Base unterscheiden und mit einer fluoreszierenden Base enden. Die einzelnen DNA-Fragmente werden ihrer Größe nach im Anschluss an die PCR im Sequenzer durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wird dann die Basensequenz anhand der Fluoreszenzmarkierung ermittelt.

3.1.9 DNA-Gelelektrophorese

Eine DNA-Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Produkte aus der LightCycler-PCR die jeweils erwartete Größe aufwiesen. Bei der DNA-Gelelektrophorese wandert negativ geladene DNA unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes durch das Agarosegel, wobei größere DNA-Fragmente langsamer wandern als kleinere DNA-Fragmente.

Die Größe der DNA-Fragmente kann mithilfe eines zusätzlich aufgetragenen Längenstandards bestimmt werden. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in TAE-Puffer durch aufkochen gelöst und der Ansatz in eine dafür vorgesehene Kammer gegossen. Die DNA-Proben wurden vor Beladen des Gels mit einem 6 x Auftragungspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte dann bei einer angelegten Spannung von 100V. Anschließend wurde die DNA in einem mit Ethidiumbromid versetzten Wasserbad angefärbt. So konnte die DNA aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids durch eine UV-Beleuchtung sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der DusCol-1B-Zellen erfolgte in Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (DMEM), das mit fetalem Kälberserum (Endkonzentration 10 %), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 67 mM Asparagin, 67 mM Arginin und 10 mM HEPES ergänzt wurde. Für die Aufrechterhaltung der stabilen Expression transfizierter Zellen wurde entsprechend der jeweiligen Resistenzen Neomycin (1 mg/ml) oder Blasticidin (5 µg/ml) in das Medium gegeben.

Die Kultivierung der BPH-1-Zellen erfolgte in RPMI-Medium, das mit 5 % fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin versetzt wurde. Auch hier wurde durch Zugabe von Blasticidin (5 µg/ml) die Aufrechterhaltung der stabilen Expression nach Transfektion sichergestellt. Die Kultivierung von LNCaP und MCF-7 Zellen erfolgte im RPMI-Medium mit den selben Zusätzen wie bei BPH-1 Zellen, jedoch unter Zugabe von 10 % FCS.

Die Kultivierung der verschiedenen Zellen erfolgte im CO₂-Inkubator (5 %) bei einer Temperatur von 37 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Passagiert wurden die Zellen einmal pro Woche mit einer Trypsin-EDTA-Lösung. Die Reaktion wurde mit Zellkulturmedium gestoppt und ein Zehntel der Zellsuspension wurde in neue Zellkulturflaschen überführt.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Um einen ausreichenden Bestand der verschiedenen Zelllinien zu gewährleisten, wurden die Zelllinien eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden die Zellen in Suspension mit 10% DMSO versetzt und in mehreren aufeinander folgenden Gefrierstufen eingefroren. Zum Schluss wurden die Zellen in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Kryotank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Um die eingefrorenen Zellen wieder zu rekultivieren, wurden diese bei 37°C aufgetaut und mit frischem Medium versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min, wurde der

Überstand abgenommen, die Zellen mit frischem Medium resuspendiert und diese Suspension in eine neue Zellkulturflasche überführt.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 oder 1:4 mit einer Trypanblau-Lösung gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Die Zellzahl pro ml kann berechnet werden, wenn der Mittelwert der Zellzahlen aus den vier großen Quadraten gebildet und mit 10^4 sowie dem Verdünnungsfaktor (Zellsuspension / Trypanblau) multipliziert wird. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wird die Zellzahl pro ml mit dem Volumen der Zellsuspension multipliziert.

3.2.4 Transfektion von humanen Zellen mit FuGENE 6

Mithilfe dieser Methode wird Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Hierfür wurden die zu transfizierenden Zellen 24 Stunden vor der Transfektion in 6 Well-Platten in einer Konfluenz von 50-80% ausgesät. Die Transfektion wurde entsprechend der Herstellerangaben nach der Liposomen-Methode mit dem FuGENE-6-Transfektionsreagenz der Firma Roche durchgeführt. Dabei wurden FuGENE (μl) und DNA (μg) immer im Verhältnis von 3:1 bzw. 6:1 eingesetzt. Aus den negativ geladenen Nukleinsäuren und den positiv geladenen Liposomen bildet sich ein Komplex, der auf die Zellen gebracht wird und mit der Zellmembran fusioniert. Der Komplexinhalt gelangt schließlich durch Endocytose in das Zellinnere. Drei Tage nach der Transfektion wurde entsprechend der transfizierten DNA Selektionsmedium auf die Zellen gegeben, um nicht erfolgreich transfizierte Zellen zu eliminieren.

3.2.5 Zellsynchronisation durch Serumentzug

Da die Expression von BRCA1 und BRCA2 bekanntermaßen zellzyklusabhängig erfolgt, muss bei der Untersuchung der Expression dieser Proteine sichergestellt sein, dass sich die zu vergleichenden Zelllinien in ähnlichen Zellzyklusphasen befinden. Hierzu wurde 24 Stunden nach Aussaat das Medium der Zellen durch serumarmes Medium (mit 0,5% FCS) ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das serumarme Medium gegen Medium mit normalem FCS-Gehalt

ausgetauscht. Diese Methode hat zur Folge, dass die Zellen aufgrund des fehlenden Serums in der G1- bzw. G0-Phase arretieren und erst nach Zugabe von Serum-haltigem Medium wieder in den Zellzyklus einsteigen.

3.2.6 Adhäsionsassay

Um die Adhäsivität der verschiedenen transfizierten Zellen an Laminin (Komponente der EZM) zu untersuchen, wurde der Adhäsionsassay wie früher beschrieben durchgeführt (11). Hierfür wurden Zellkulturschalen mit jeweils 4 Lochverstärkungsringen als Zählfelder versehen. Die Zellkulturschalen wurden zunächst über Nacht bei 4°C mit Laminin (10 µg/ml) inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit einer 3%igen BSA-Lösung bei 4°C über Nacht, um die unspezifischen Bindestellen zu blockieren. Die Zellen wurden abgelöst, mit Hilfe von Zellsieben vereinzelt und eine Zellsuspension mit 5000 Zellen pro ml wurde eingestellt. 2ml der Zellsuspension wurden dann auf je drei vorbereiteten Zellkulturschalen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 15 min im Brutschrank wurden die nicht adhären gewordenen Zellen abgesaugt und zweimal mit PBS abgewaschen. Anschließend wurden die adhären Zellen in den vormarkierten Zählfeldern mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops ausgezählt. Die so gewonnenen Werte wurden mittels Mann-Whitney-Test mithilfe des SPSS-Programms statistisch ausgewertet.

3.2.7 Herstellung von konditioniertem Medium

Konditioniertes Medium wurde für verschiedene zellbiologische Untersuchungen als sogenanntes Chemoattractant verwendet. Die Herstellung des konditionierten Mediums erfolgte, indem ca. 80% konfluente COS-7 Zellen in je 25ml Optimem-Medium für 24 Stunden kultiviert wurden. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und abzentrifugiert, um die im Medium befindlichen Zellen zu entfernen. Das Medium wurde aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.8 Matrigel-Invasions-Assay

Die Effekte auf das Invasionsverhalten von Tumorzellen wurden mithilfe des Matrigel-Invasions-Assays untersucht. Die Durchführung erfolgte wie von Engers et al beschrieben (11). Im Matrigel-Invasions-Assay müssen Tumorzellen eine rekonstruierte Basalmembran (Matrigel) durch aktive Invasion überwinden (122). Hierzu wurden die Transwellmembranen mit je 25 μl einer Matrigellösung (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtet. Die Beschichtung erfolgte in zwei Schritten, wobei die Transwells nach jeder Beschichtung für 30 min im Brutschrank zur Aushärtung inkubiert wurden. Die Zellen wurden abgelöst, mit Hilfe von Zellsieben vereinzelt und gezählt. Eine Zellzahl von 1000 Zellen / 1 μl Optimem-Medium wurde eingestellt und 50 μl der Zellsuspension (= 50000 Zellen) wurden auf je eine beschichtete Transwellmembran pipettiert. Die unteren Kammern der Transwellmembranen wurden jeweils mit 500 μl konditioniertem Medium befüllt (siehe Abbildung 3.2.8.1).

Das Transwellmembransystem

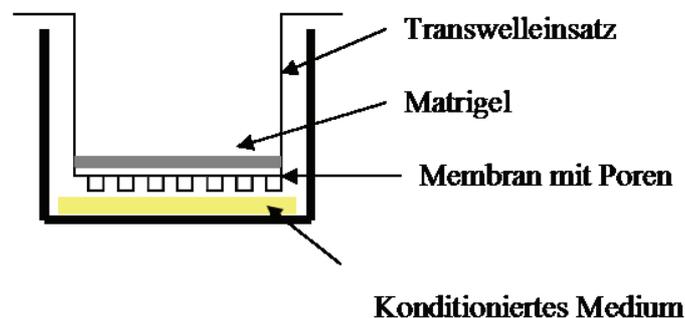


Abbildung 3.2.8.1: Das Transwellssystem. Die Membran der Transwelleinsätze weist Poren mit einem Durchmesser von 8 μm auf. Die Membran wird mit der Matrigellösung beschichtet. Auf die ausgehärtete Matrigellösung wird die Zellsuspension pipettiert. Zellen müssen das Matrigel aktiv durchdringen, um zur unteren Fläche der porösen Membran zu gelangen. Als Chemoattractant dient dabei das konditionierte Medium in der unteren Kammer des Transwellsystems.

Nach einer Inkubation von 24 Stunden im Brutschrank folgte die Fixierung und Färbung der invadierten Zellen auf der Unterseite der Transwellmembranen. Hierfür wurden zunächst nicht invadierte Zellen auf der Membranoberseite der Transwellmembraneinsätze durch vorsichtiges Wischen mit einem Wattestäbchen eliminiert. Anschließend wurden die invadierten Zellen auf den Membranunterseiten mit Methanol fixiert und mit Hämalaun und Eosin gefärbt. Im Anschluss daran wurden die Membranen kurz in Wasser gespült und nacheinander in eine

aufsteigende Alkoholreihe, bestehend aus 50%, 70%, 70%, 96%, 96%, 100% und 100% Ethanol, gesetzt. Zuletzt wurde die Membran der Transwelleinsätze mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten, in Xylol getaucht und auf einen Objektträger mit dem Zellrasen nach oben egedeckt. Die invadierten Zellen wurden im Anschluss mithilfe eines Lichtmikroskops gezählt und die Ergebnisse mittels Mann-Whitney-Test des SPSS-Programms statistisch ausgewertet.

3.2.9 Migrationsassay

Um die Effekte der Einzelzellmigration zu untersuchen, wurde ein Migrationsassay mit Fibronectin-beschichteten Transwell-Membranen durchgeführt. Die Durchführung dieses Assay erfolgte analog zur Durchführung des Matrigel-Invasions-Assays, wobei die Transwellmembranen nicht mit Matrigel sondern mit Fibronectin beschichtet wurden. Hierfür wurden die Einsätze der Transwellmembranen mit einer Fibronectinlösung ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$) für eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend die Zellen darauf ausgesät. Dieser Ansatz wurde nach der Aussaat für 6 Stunden im Brutschrank inkubiert, bevor die Fixierung und Färbung der Zellen analog zum Invasionsassay folgte. Auch in diesem Assay wurde konditioniertes Medium als Chemoattractant verwendet. Zum Schluss wurden die migrierten Zellen mithilfe eines Lichtmikroskops ausgezählt und die Ergebnisse mittels Mann-Whitney-Test des SPSS-Programms statistisch ausgewertet.

3.2.10 Soft-Agar-Assay

Im Soft-Agar-Assay werden die Zellen nach Vereinzelung in einem Agargel ausgesät, wodurch der Kontakt zu benachbarten Zellen und auch die Anheftung an den Boden der Zellkulturflaschen verhindert werden. Hierfür wurde zunächst ein 0,5%iger „Base-Agar“ hergestellt, indem 1,25%iger Agar in ddH₂O in der Mikrowelle verflüssigt und dann mit vorgewärmten 2 x Vollmedium zu 0,5%igem Agar verdünnt wurde. Im Anschluss wurden je 3ml des Base-Agars in ein Well einer 6-Well-Platte pipettiert und zur Aushärtung in den Kühlschrank gestellt. Pro Zelllinie wurde die Untersuchung dabei im Dreifachansatz durchgeführt. Nachdem der Base-Agar ausgehärtet war, wurden 3000 Zellen in entsprechend hergestelltem 0,4%igem Top-Agar resuspendiert und anschließend auf den Base-Agar gegossen. Nach der Aushärtung des Top-

Agars wurden die Zellen für drei bis vier Wochen im Brutschrank inkubiert, wobei der Top-Agar regelmäßig mit Medium überschichtet wurde, um eine Austrocknung des Top-Agars zu verhindern. Zuletzt wurde die Kolonienbildung zur Dokumentation fotografiert.

3.2.11 Colony formation assay

Um die zelluläre Transformation der verschieden transfizierten Zellen zu untersuchen, wurde der colony formation assay, wie früher beschrieben, durchgeführt (30). Die verschieden transfizierten DusCol-1B Zellen wurden konfluent in Zellkulturschalen ausgesät, regelmäßig gefüttert und nach ca. 10 Tagen wurde das Wachstum fotodokumentiert.

3.2.11 Invasionsassay im 3D Kollagengel

Dieser Assay dient der Bestimmung der kollektiven Invasion von Tumorzellen im dreidimensionalen Raum. Die Untersuchung wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Friedel (Nijmegen, Niederlande; früher: Würzburg), wie von ihm und seinen Mitarbeitern beschrieben, durchgeführt (125,126). Hierfür wurden dreidimensionale Zellsphäroide in eine 3D-Kollagenmatrix (Kollagen I) eingebracht und das Invasionsverhalten wurde mittels „time-lapse videomicroscopy“ über einen mehrtägigen Verlauf fotodokumentiert.

3.2.12 MTT-Assay

Im MTT-Assay wird die Lebensfähigkeit und das Wachstum von Zellen gemessen. Hierbei wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen gemessen und zwar unabhängig davon, ob die Zellen gerade DNA synthetisieren oder nicht. Das 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-Bromid (MTT) gehört zur Klasse der Tetrazoliumsalze und dringt aktiv in die Zellen ein. In den Zellen bewirken aktive Mitochondrien ein Aufbrechen des Tetrazoliumrings, wodurch das alkohollösliche dunkelblaue Formazan entsteht. Dieses wird nach der Lyse der Zellen durch einen SDS-haltigen Puffer freigegeben. Die Intensität der alkoholischen Formazanlösung wird anschließend photometrisch mittels eines Biorad Microplate Readers bestimmt (Testwellenlänge 570nm, Referenzwellenlänge 655nm). Für

den Assay wurden 5000 Zellen pro Well einer 96-Wellplatte im zwölfmalig Ansatz ausgesät. Die Untersuchung wurde an sechs aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, so dass pro Zelllinie und Tag eine 96-Well-Platte ausgesät wurde. Nach Zugabe von 50µl der MTT-Lösung und Inkubation für zwei Stunden im Brutschrank wurde der Überstand abgenommen. 200µl DMSO pro Well wurden auf die Zellen pipettiert und alles wurde für 15min auf dem Schüttler inkubiert. Zuletzt folgte die photometrische Auswertung mittels eines Biorad Microplate Readers.

3.2.13 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Um herauszufinden, über welche Signalwege die Beeinflussung der Expression von BRCA1 und BRCA2 erfolgt, sollten mehrere Signalwege „downstream“ von Rac selektiv blockiert werden. Hierfür wurden stabil transfizierte DusCol-1B und BPH-1 Zellen in 6cm Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt, gegen Optimem ausgetauscht und die Inhibitoren wurden zugegeben. Hierfür wurden die stabil mit C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B und BPH-1-Zelllinien mit selektiven Inhibitoren des ERK-Signalwegs (PD98059 und U0126) (93,94), des p38-Signalwegs (SB 203580) (96), des ROS-Signalwegs (Catalase) (97), des JNK-Signalwegs (SP600125) (95) und des Phosphatidylinositol-3Kinase-Signalweg (LY294002, Wortmannin) (98,99) für 24 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurden C1199-Tiam1-transfizierte DusCol-1B und BPH-1 Zellen zur Kontrolle mit DMSO, hitzeinaktivierter Catalase und oder ohne Inhibitor inkubiert. Auch unbehandelte mock-transfizierte DusCol-1B und BPH-1 Zellen dienten als zusätzliche Kontrollen. Nach der Inhibitor-Inkubation für 24 Stunden wurden die behandelten Zellen für die entsprechenden Expressionsanalysen lysiert.

3.2.14 Asservierung und Aufbereitung von Zellkulturüberständen

Um die Expression sezernierter Proteine im Western Blot bestimmen zu können, mussten die Proteine aus dem Zellkulturüberstand aufkonzentriert werden. Hierfür wurden die Zellen in 10 cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Dann wurde das Kultivierungsmedium durch Optimem-Medium ersetzt. Nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen in Optimem-Medium wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, abzentrifugiert und mittels Amicon Ultra-Zentrifugationsröhrchen nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert. Die

aufkonzentrierten Mediumüberstände wurden im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.15 Gelatin-Zymographie

Die Gelatin-Zymographie ermöglicht es, die Expression und Aktivität der invasionsrelevanten MMPs (2 und 9) semiquantitativ zu bestimmen. Die Durchführung dieser Versuche erfolgte wie bei Engers et al beschrieben (11). Hierfür wurden die Zellkulturüberstände, wie unter 3.2.14 beschrieben, aufkonzentriert, die Proteinkonzentration wurde bestimmt und die Proben wurden mit nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 37°C inkubiert und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Polyacrylamidgel bestand aus einem 8 %igem Agarose-Trenngel, welches 0,2 % Gelatine enthielt und dem üblichen Sammelgel. Nach der elektrophoretischen Auftrennung bei 18 mAmp, wurde das Gel für 60 min mit einer 2,5 %igen Triton-X-100-Lösung auf dem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde dabei nach 30min ausgewechselt. Anschließend folgte eine 36-stündige Inkubation des Gels mit dem Reaktionspuffer, wobei auch hier der Puffer nach einer Stunde ausgetauscht wurde. Danach erfolgte eine 4-stündige Färbung des Gels mit einer Comassie-haltigen Färbelösung. Zum Schluss wurde das Gel durch mehrmalige Inkubation in der Entfärbelösung entfärbt und das Ergebnis wurde fotodokumentiert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot ist es erforderlich, die Zellen zunächst zu lysieren. Hierfür wurden die Zellen in Zellkulturschalen ausgesät. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit der entsprechenden Menge (abhängig von der Zelldichte) Lysispuffer versehen. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgekratzt und sonifiziert. Zuletzt wurden die gewonnenen Lysate für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Sofern die gewonnenen Lysate nicht direkt im Anschluss an die Lyse benötigt wurden, wurden sie schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Proteinlysate wurde mit dem Bradford-Reagenz der Firma BioRad bestimmt. Die Bestimmung beruht auf einer Farbreaktion der Proteinlösung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 in Phosphorsäure (123). Ohne Interaktion mit Proteinen liegt das Absorptionsmaximum des Farbstoffs bei einer Wellenlänge von 465 nm. Durch Interaktion mit den Aminosäureseitenketten der Proteine, insbesondere mit den Seitenketten von Arginin, aber auch von Histidin, Lysin, Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 595 nm (124). Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Kalibriergeraden bestimmt, die mit einer BSA- (Rinderserumalbumin) Lösung bekannter Konzentration erstellt wurde. Zu 200 μl der Bradford-Lösung wurden 1 bis 10 μl der Proteinlösung gegeben und auf ein Gesamtvolumen von 1 ml mit Wasser aufgefüllt. Nach 5 min wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert ohne Protein gemessen. Extinktionswerte zwischen 0,2 und 0,8 liegen im linearen Bereich und wurden anhand der Kalibrierung ausgewertet.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem diskontinuierlichen Puffersystem (130,131). Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele und für die Elektrophorese wurde ein Minigel-System der Firma Hoefer eingesetzt. Die Polyacrylamidkonzentration im Trenngel richtete sich nach dem Molekulargewicht der zu trennenden Proteine, um eine optimale Auftrennung dieser zu erreichen. Das Trenn- und Sammelgel wurde entsprechend der Angaben in den Tabellen 2.16.1 und 2.16.2 hergestellt. Die mit SDS-Ladepuffer versehenen Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei 95°C denaturiert. Zusätzlich zu den Proteinproben wurde ein Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1xSDS-Laufpuffer bei 200 V.

3.3.4 Western Blot

Der Western Blot dient dem Transfer der zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine spezifische Membran (127). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Nitrozellulose-Membran der Firma Whatman GmbH verwendet. Der Transfer erfolgte entweder mittels Wet-Blot- oder Semidry-Blot-Verfahren. Wobei der Aufbau bei beiden Methoden im Sandwichverfahren erfolgte. Der Transfer im Wet-Blot erfolgte bei 90V, wobei die Zeit des Transfers in Abhängigkeit von der jeweiligen Proteingröße variierte. Der Transfer im Semidry-Blot erfolgte bei 400mA, wobei auch hier die Transferzeit in Abhängigkeit von den zu untersuchenden Proteingrößen variierte.

3.3.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Im Anschluss an den Western Blot folgte die Detektion und Visualisierung der Zielproteine unter Verwendung von Antikörpern. Nach dem Blot wurde zunächst der Transfererfolg durch eine Ponceau-S-Färbung der Firma Sigma überprüft. Im Anschluss wurden zunächst unspezifische Bindestellen durch Inkubation der Membran mit Blockierungslösung für 30min bei RT, blockiert. Dann folgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu untersuchende Protein gerichtet war. Die Inkubationszeit und die Verdünnung des eingesetzten

Antikörpers richteten sich nach den Angaben der Hersteller der jeweiligen Antikörper. Anschließend wurden überschüssige Antikörper-Moleküle in mehreren aufeinander folgenden Waschschritten entfernt. Danach folgte die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Die Auswahl des Sekundärantikörpers richtete sich danach, aus welchem Organismus der Primärantikörper gewonnen wurde und danach, welches Detektionssystem ausgewählt wurde. Grundsätzlich standen zwei Detektionssysteme zur Verfügung. Zum einen Immundetektion über Chemolumineszenz, unter Verwendung von Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper mit anschließender Inkubation in einer Peroxidase-Nachweislösung und Detektion auf geeigneten Chemolumineszenzfilmen. Zum anderen über Immundetektion über Fluoreszenz unter Verwendung fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper mit anschließender Detektion über das Odyssey-System von Licor. Dieses Gerät kann Fluoreszenzen bei 680nm und 800nm erkennen und darstellen.

3.3.6 Immuncytochemische Analyse von Proteinexpressionen

Mit Hilfe der Immuncytochemie kann die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen untersucht werden. Für die Färbungen wurden Zellen verschiedener Zelllinien in 6 Well-Platten auf autoklavierten Deckgläschen ausgesät. Nachdem die Zellen adhärent geworden waren und in der gewünschten Dichte vorlagen, wurden sie mit 3,7%igem Formaldehyd für 30min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, zur Permeabilisierung für 3min mit einer 0,5%igen Triton X-100-Lösung inkubiert und erneut gewaschen. Zum Blocken wurden die Deckgläschen für 30min in eine 1%ige BSA-Lösung in PBS gelegt. Nach dem Blocken wurden die Deckgläschen in die Antikörperlösung gelegt und für eine Stunde im Feuchtinkubator inkubiert. Die Antikörper wurden in der 1%igen BSA-Lösung verdünnt, wobei sich die Verdünnung nach den Angaben der Hersteller richtete. Die Zellen wurden erneut gewaschen und in die Sekundärantikörperlösung gelegt. Zur Gegenfärbung des Zytoskeletts der Zellen enthielt die Sekundärantikörperlösung 0,1% Tritc-Phalloidin. Da die Sekundärantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, wurden die Zellen für eine Stunde im Dunkeln im Feuchtinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und für 10 min mit einer 0,1%igen DAPI-Lösung zur Färbung der Kerne inkubiert. Nach weiteren Waschgängen

wurden die Deckgläschen eingedeckelt und fixiert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

4. Ergebnisse

4.1 Effekt eines „knockdown“ von Tiam1 auf die BRCA2-Expression

Da die stabile Überexpression von C1199-Tiam1 zu einer Herabregulation von BRCA2 in humanen Kolonkarzinomzellen (DusCol-1B) führt, wurde überprüft, ob dieser inverse Tiam1-BRCA2-Zusammenhang auch umgekehrt durch einen „knockdown“ von Tiam1 nachweisbar ist. Hierzu wurden zunächst DusCol-1B-Zellen jeweils mit leerem Vektor (mock) oder einem Tiam1-spezifischen sh-RNA-Konstrukt (sh-Tiam1) stabil transfiziert. Dieses sh-Tiam1-Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. J. Collard (Amsterdam) zur Verfügung gestellt. Der Transfektionserfolg wurde mittels Western Blot überprüft und ist in Abbildung 4.1.1A abgebildet. Nachdem die erfolgreiche Herabregulation von Tiam1 durch das sh-RNA-Konstrukt sicher gestellt war, wurde im nächsten Schritt die BRCA2-Expression in diesen stabil transfizierten DusCol-1B-Zellen untersucht (Abbildung 4.1.1B). Dabei zeigte sich, dass der „knockdown“ von Tiam1 zu einer Expressionssteigerung von BRCA2 führt.

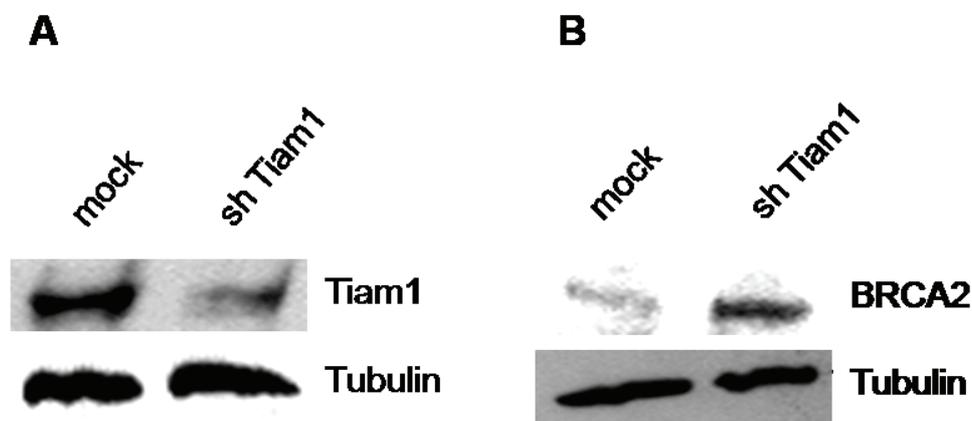


Abbildung 4.1.1: Nachweis der Hochregulation von BRCA2 nach „knockdown“ von Tiam1 durch shRNA. A Verminderte Tiam1-Expression in DusCol-1B-Zellen nach stabiler Transfektion mit sh-RNA für Tiam1 (sh-Tiam1) im Vergleich zum leeren Vektor (mock). B BRCA2-Expression in diesen Zellen. Der Nachweis der jeweiligen Proteine erfolgte im Western Blot. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführte Untersuchungen.

4.2 Überprüfung der am Beispiel humaner Kolonkarzinomzellen nachgewiesenen Tiam1-induzierten Herabregulation der BRCA2-Expression in anderen humanen epithelialen Zellen

Um auszuschließen, dass es sich bei der Herabregulation von BRCA2 durch C1199-Tiam1 in humanen Kolonkarzinomzellen um einen zelllinienspezifischen Effekt handelt, wurde untersucht, ob dieser Effekt auch in anderen epithelialen Zellen nachweisbar ist. Aufgrund der Ergebnisse zur Untersuchung der prognostischen Relevanz von Tiam1 im Prostatakarzinom, in der gezeigt wurde, dass Tiam1 in 95 % der Prostatakarzinome signifikant höher exprimiert wird (29), sollte dieser Effekt auch in Prostatazelllinien untersucht werden. Hierfür wurden die benigne Prostataepithelzelllinie BPH-1 und die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP ausgewählt. Außerdem wurde dieser Effekt in der Brustkrebszelllinie MCF-7 untersucht, da Tiam1 auch in die Entstehung von Mammakarzinomen eingebunden ist und BRCA2 selbst im Brustkarzinom entdeckt wurde (28). So wurden die ausgewählten epithelialen Zellen (BPH-1, LNCaP und MCF-7) jeweils stabil mit leerem pLZRS Vektor (mock) und C1199-Tiam1 mittels FuGene Transfektionsreagenz (Roche) transfiziert und der Transfektionserfolg im Western Blot überprüft (Abbildung 4.2.1.A). Nach erfolgreicher Transfektion der Zellen mit C1199-Tiam1 wurden die Effekte auf die BRCA2-Expression untersucht (Abbildung 4.2.1.B). Dabei zeigte sich, dass C1199-Tiam1 in allen drei Zelllinien jeweils zu einer deutlichen Hemmung der BRCA2-Expression führt, so dass es sich bei diesem Effekt nicht um einen zelllinienspezifischen Effekt, sondern vielmehr um einen übergeordneten molekularen Mechanismus handeln dürfte, der zumindest in mehreren epithelialen Zellsystemen Gültigkeit besitzt.

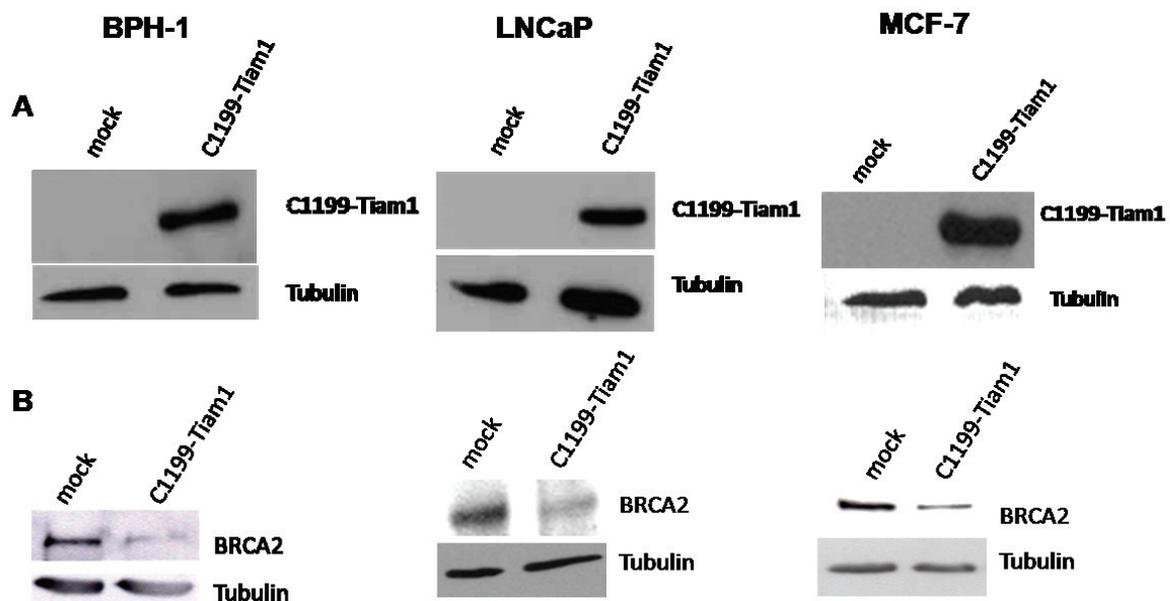


Abbildung 4.2.1: Effekt von C1199-Tiam1 auf die BRCA2-Expression in BPH-1, LNCaP und MCF-7 Zellen. A) Transfektionsnachweis von C1199-Tiam1 in BPH-1, LNCaP und MCF-7 Zellen im Western Blot. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. B) Expressionsuntersuchung von BRCA2 in den erfolgreich transfizierten Zellen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche.

4.3 Funktionelle Relevanz der Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA2

Um die funktionelle Relevanz der Tiam1-induzierten BRCA2-Herabregulation zu untersuchen, wurden *in vitro* verschiedene zellbiologische Assays durchgeführt. Mit Hilfe dieser Assays konnte in der Vergangenheit bereits die funktionelle Relevanz von Tiam1 für die Regulation von Invasion und Migration nachgewiesen werden (11). Alle funktionellen Untersuchungen wurden mit den stabil transfizierten Zelllinien DusCol-1B-mock, DusCol-1B-C1199, DusCol-1B-C1199-mock und DusCol-1B-C1199-BRCA2-Pool durchgeführt (vgl. Abbildung 1.6.1). Diese Zelllinien wurden bereits im Rahmen der Vorarbeiten etabliert.

4.3.1 Effekt auf die Proliferation

Um die Proliferation der verschieden transfizierten DusCol-1B-Zellen zu messen und die Beeinflussung des Zellwachstums durch C1199-Tiam1 und BRCA2 zu überprüfen, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Tiam1 in Analogie zu Beobachtungen in anderen Zellsystemen (135), auch in DusCol-1B Zellen zu einer gesteigerten Proliferation im Vergleich zum Leervektor (mock) führt. Die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen hat scheinbar keinen Einfluss auf die C1199-Tiam1-induzierte Proliferationssteigerung. C1199-Tiam1 und BRCA2-transfizierte DusCol-1B Zellen zeigten nahezu dieselbe Proliferationsaktivität (siehe Abbildung 4.3.1.1).

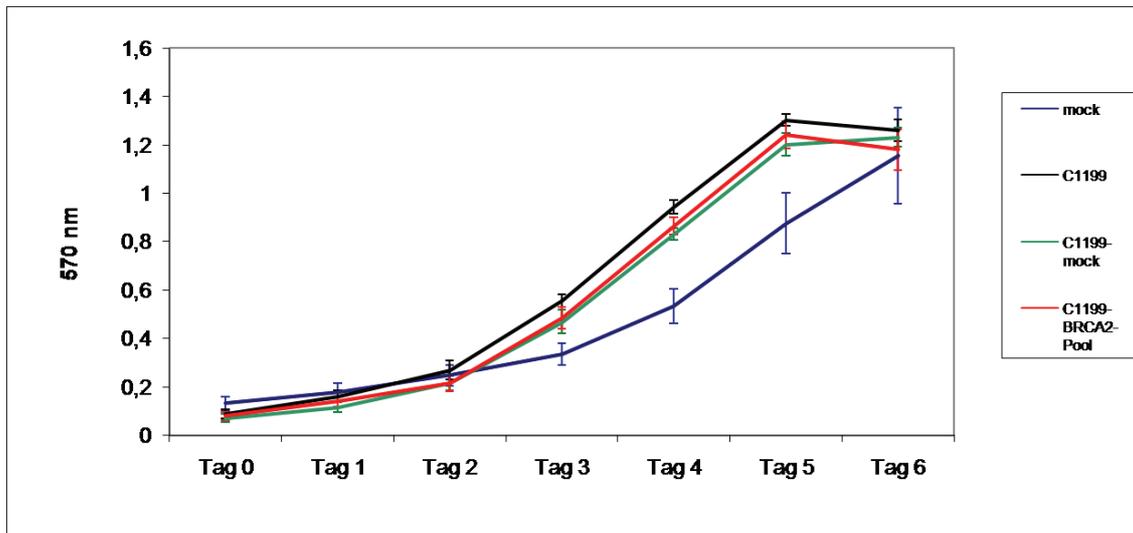


Abbildung 4.3.1.1: Vergleich der Proliferationsaktivität von mock-, C1199-, C1199-mock- und C1199-BRCA2-Pool transfizierten DusCol-1B Zellen mittels MTT Assay. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 12 Messwerten der jeweiligen Zelllinie. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Untersuchungen.

4.3.2 Effekt auf die Zell-Substratadhäsion

Im Rahmen der Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Tiam1 zu einer gesteigerten Adhäsion an Laminin und Kollagen führt (11). Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen auf die C1199-Tiam1-induzierte Adhäsionssteigerung auf Laminin, als Komponente der extrazellulären Matrix, hat. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression von C1199-Tiam1 zu einer signifikanten ($p < 0,001$) Adhäsionssteigerung auf Laminin führt (Abbildung 4.3.2.1). Durch Reexpression von BRCA2 in den C1199-Tiam1-transfizierten Zellen wird diese Adhäsionssteigerung nahezu vollständig antagonisiert ($p = 0,002$).

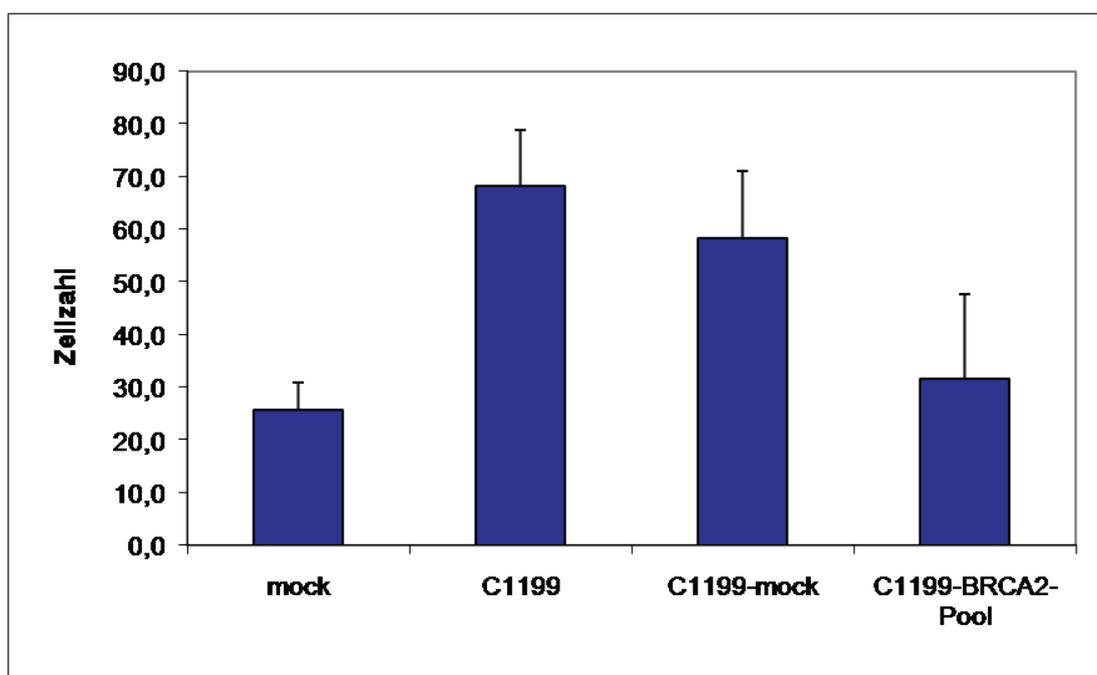


Abbildung 4.3.2.1: Zelladhäsion an Laminin. DusCol-1B Zellen, die entweder mit dem leeren pLZRS Vektor (mock), C1199-Tiam1 (C1199), C1199-Tiam1 und dem leeren pCL1 Vektor (C1199-mock) oder C1199-Tiam1 und BRCA2 (C1199-BRCA2-Pool) transfiziert worden waren, wurden 15 Minuten auf Laminin-beschichteten Zellkulturschalen inkubiert. Nach Entfernen aller nicht adhärenter Zellen, wurde die Anzahl der adhärenter Zellen bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen 10 verschiedener Messwerte eines Adhäsionsassays. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 3 voneinander unabhängig durchgeführte Untersuchungen.

4.3.3 Effekt auf die Zell-Migration

In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass Tiam1 die Migration humaner Karzinomzellen beeinflusst. Die dabei beobachteten Effekte waren teils stimulierend, teils inhibierend und hingen teils vom Zelltyp, teils vom verwendeten Substrat und teils von der Frage ab, ob die Ausbildung E-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Kontakte unter den jeweiligen Versuchsbedingungen möglich war oder nicht (7,90). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Einzelzell-Migration der verschieden transfizierten DusCol-1B-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen auf Fibronectin-beschichteten Transwellmembranen ausgesät, 5 Stunden inkubiert und anschließend die durch die Membran transmigrierten Zellen gezählt. Dabei zeigte sich, dass C1199-Tiam1 zu einer signifikanten ($p = 0,003$) Hemmung der Migration durch Fibronectin beschichtete Transwellmembranen führt (Abbildung 4.3.3.1) und dieser Effekt durch Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen signifikant ($p = 0,05$) revertiert wird.

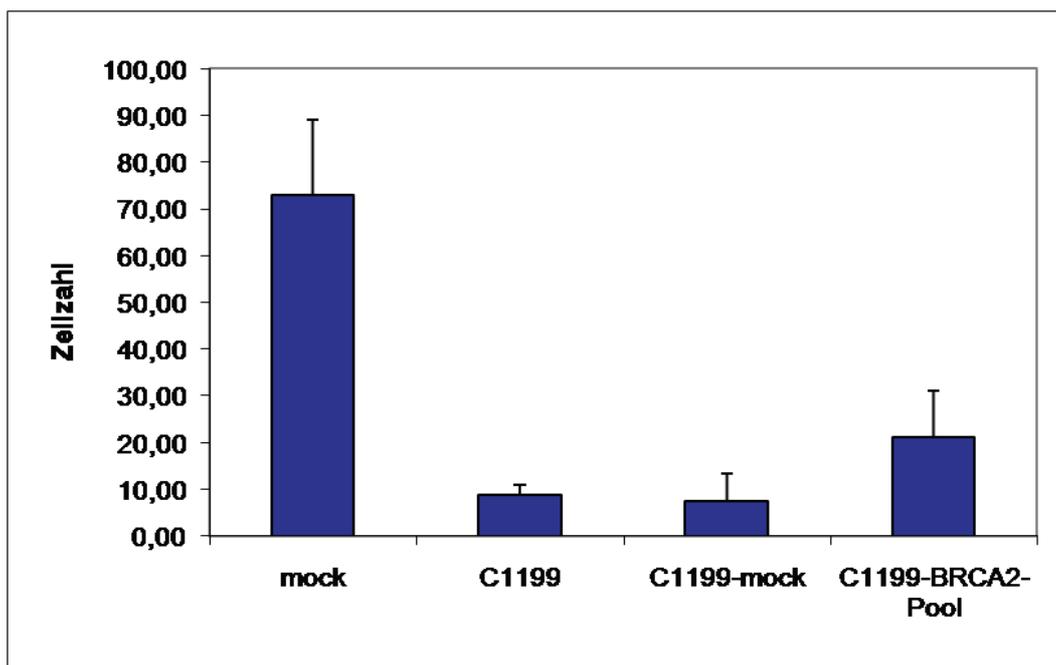


Abbildung 4.3.3.1: Zell-Migration durch Fibronectin beschichtete Transwells. Hierfür wurden die entweder mit dem leeren pLZRS Vektor (mock), C1199-Tiam1 (C1199), C1199-Tiam1 und dem leeren pCL1 Vektor (C1199-mock) oder C1199-Tiam1 und BRCA2 (C1199-BRCA2-Pool) transfizierten DusCol-1B Zellen auf Fibronectin-beschichtete Transwellmembranen ausgesät und die Anzahl der transmigrierten Zellen nach 5 Stunden bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 5 Messwerten innerhalb eines Versuchsansatzes. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

4.3.4 Effekt auf die Matrigelinvasion

Im Matrigelinvasionsassay kann die Fähigkeit von Zellen untersucht werden, eine rekonstruierte Basalmembran in Form des Matrigels durch aktive Invasion zu überwinden.

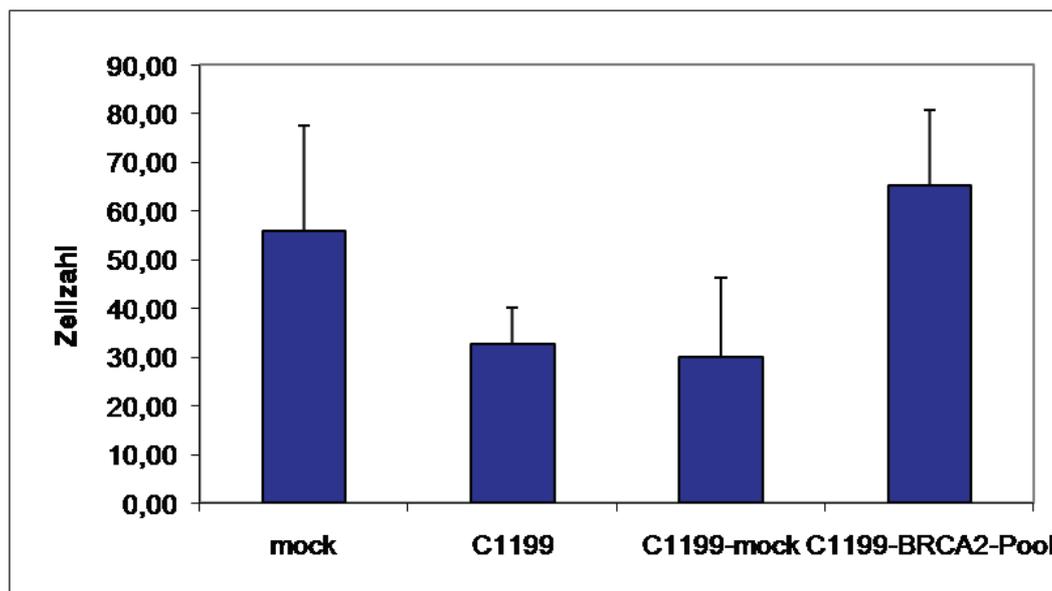


Abbildung 4.3.4.1: Invasion auf Matrigel beschichteten Transwellmembranen. DusCol-1B-Zellen, die entweder mit dem pLZRS-Vektor (mock), C1199-Tiam1 (C1199), C1199-Tiam1 und dem leeren pCL1-Vektor (C1199-mock) oder C1199-Tiam1 und BRCA2 (C1199-BRCA2-Pool) transfiziert worden waren, wurden auf matrigelbeschichteten Transwellmembranen ausgesät, die invadierten Zellen wurden nach 24h angefärbt und ausgezählt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 6 Messwerten einer Untersuchung. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Untersuchungen.

Die Untersuchung der Matrigelinvasion ergab, dass C1199-Tiam1 die Invasion von DusCol-1B-Zellen signifikant ($p = 0,01$) hemmt im Vergleich zum leeren pLZRS Vektor (siehe Abbildung 4.3.4.1). Gleichzeitig führt die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B Zellen zur signifikanten ($p = 0,025$) Antagonisierung dieses Effekts. Das dieser Effekt tatsächlich auf die Expression von BRCA2 zurückzuführen ist und nicht auf den transfizierten Vektor, wird dadurch gezeigt, dass der leere pCL1 Vektor (C1199-mock) dieselbe Hemmung der Invasion in DusCol-1B-Zellen hervorruft, wie C1199-Tiam1 allein im Vergleich zum leeren pLZRS Vektor.

4.3.5 Effekte im Soft-Agar-Assay

Der Soft-Agar-Assay dient eigentlich dazu, die transformierenden Eigenschaften der Zellen *in vitro* zu untersuchen. Da es sich bei dem untersuchten Zellsystem (DusCol-1B Zellen) allerdings um maligne Zellen handelt, kann man hier nicht von transformierenden Effekten sprechen, vielmehr kann man mit diesem Assay auf die Aggressivität der Zellen schließen. So wurde die Koloniebildung in den verschiedenen transfizierten DusCol-1B-Zellen im Soft-Agar-Assay untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Leervektor-transfizierten DusCol-1B-Zellen selbst über einen Zeitraum von vier Wochen keine Kolonien ausgebildet haben. Diese Zellen konnten nur sehr schlecht im Soft-Agar wachsen (vgl. Abbildung 4.3.5.1). DusCol-1B Zellen, die stabil mit C1199-Tiam1 transfiziert wurden, bildeten deutliche Kolonien im Soft-Agar, die man zum Teil sogar schon mit dem bloßen Auge erkennen konnte. Die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B-Zellen hatte keine nennenswerte Auswirkung auf die C1199-Tiam1-induzierte Koloniebildung, sodass man davon ausgehen kann, dass die C1199-Tiam1-induzierte Koloniebildung nicht über die Herabregulation von BRCA2 vermittelt wird.

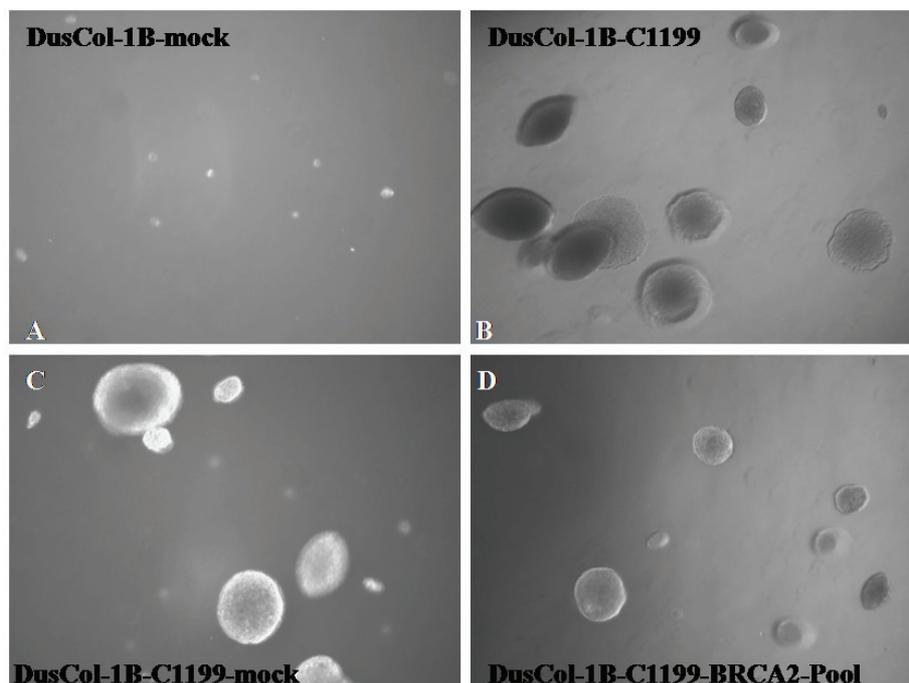


Abbildung 4.3.5.1: Kontaktabhängiges Wachstum und Kolonienbildung der mit verschiedenen cDNA transfizierten DusCol-1B-Zellen im Soft-Agar-Assay. Die verschiedenen transfizierten DusCol-1B-Zellen wurden in Form einer Einzelzellsuspension in einem Agargel eingegossen, wodurch sowohl die Anheftung an das Substrat als auch an andere Zellen verhindert wurde. Anschließend wurde das Wachstum der Zellen im Agargel beobachtet. (Originalvergrößerung x 100)

4.3.6 Effekte im colony formation assay

Analog zum Soft-Agar-Assay kann auch mit Hilfe des „colony formation assays“ die Aggressivität von Zellen untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass Leervektor-transfizierte DusCol-1B Zellen das Wachstum einstellen, wenn sie zu 100% konfluent sind (siehe Abbildung 4.3.6.1). C1199-Tiam1-transfizierte DusCol-1B Zellen hingegen wachsen nach Erreichen der Konfluenz weiter und bilden dreidimensionale Kolonien, ähnlich wie sie im Soft-Agar-Assay beobachtet werden konnten. Die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B-Zellen konnte diesen Effekt jedoch nicht revertieren (vgl. Abbildung 4.3.6.1 D).

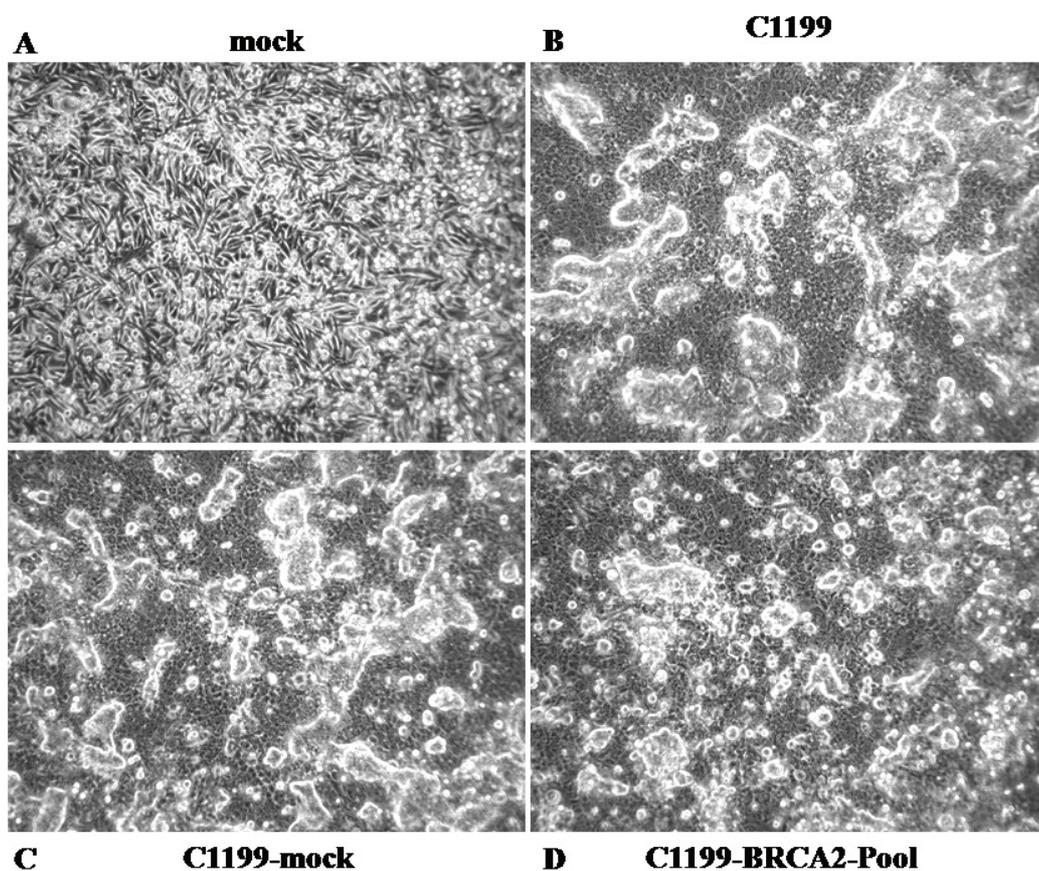


Abbildung 4.3.6.1: Colony formation assay der verschieden transfizierten DusCol-1B-Zellen. Hierfür wurden die verschieden transfizierten DusCol-1B Zelllinien in Zellkulturschalen ausgesät und eine regelmäßiger Mediumwechsel vorgenommen. Nach ca. 14 Tagen wurde das Wachstum der Zellen fotodokumentiert. (Originalvergrößerung x100)

4.3.7 Effekte auf die Zellmorphologie und das Wachstumsmuster

Im Rahmen der Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass C1199-Tiam1 ein Wachstum in soliden Zellverbänden und einen epitheloiden Phänotyp in DusCol-1B-Zellen hervorruft, wenn diese Zellen auf unbeschichteten Zellkulturschalen ausgesät werden (siehe Abbildung 4.3.7.1). Sowohl C1199-BRCA2-transfizierte als auch C1199-Tiam1 transfizierte DusCol-1B Zellen weisen den selben Phänotyp auf und wachsen in soliden Zellverbänden (siehe Abbildung 4.3.7.1). Die Herabregulation von BRCA2 hat demnach für die Ausbildung des Tiam1-induzierten Phänotyps keine Bedeutung, da die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen keine Auswirkung auf den Phänotyp der C1199-Tiam1-transfizierten Zellen hat. Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Effekte von Tiam1 zum Teil substratspezifisch sind (9,21), wurde der Phänotyp der verschieden transfizierten DusCol-1B-Zellen auch auf Kollagen I und Laminin, beides Komponenten der extrazellulären Matrix, untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zum epitheloiden Phänotyp und soliden Wachstum auf unbeschichteten Zellkulturschalen, C1199-Tiam1-transfizierte DusCol-1B Zellen auf Kollagen I und Laminin einen spindeligeren Phänotyp aufweisen (siehe Abbildungen 4.3.7.2/3). Dies lässt sich auch bei der Leervektortransfizierten DusCol-1B Zelllinie beobachten, die auf Kollagen I noch spindelig aussieht. BRCA2-C1199-Tiam1 kotransfizierte Zellen hingegen behalten auf Kollagen I den epitheloiden Phänotyp bei.

Auf Laminin-beschichteten Zellkulturschalen konnten die Leervektor-transfizierten Zellen nur kaum adhären werden im Vergleich zu C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B Zellen. Dies ist an den vielen kugelförmigen Zellen in Abbildung 4.3.7.3 B zu erkennen. Dabei erfolgte die Dokumentation des Wachstums bei allen Zelllinien am selben Tag nach der Aussaat. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Adhäsionsassays konnten C1199-Tiam1 transfizierte DusCol-1B-Zellen besser auf Laminin adhären werden und gut proliferieren. Diese Zellen breiteten sich nach und nach über die gesamte Zellkulturschale aus und bildeten schließlich einen geschlossenen Monolayer (nicht abgebildet). BRCA2- und C1199-Tiam1-kotransfizierten Zellen konnten auf Laminin kaum adhären werden, es konnten viele abgelöste Zellen im Medium beobachtet werden (nicht abgebildet). Die Zellen, die adhären wurden, proliferierten dreidimensional in die Höhe. Diese Zellen bildeten also anstatt eines Monolayers auf den Zellkulturschalen dreidimensionale Tumorzellsphäroide mit wenig Kontakt zur Laminin-beschichteten Oberfläche der Zellkulturschalen (siehe Abbildung 4.3.7.3). Die C1199-Tiam1-

induzierte Steigerung der Adhäsion an Laminin wird demzufolge in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Adhäsionsassays durch die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen unterbunden. Unverändert durch die Reexpression von BRCA2 bleibt allerdings die C1199-Tiam1-induzierte Proliferationssteigerung, die BRCA2 und C1199-Tiam1-transfizierten Zellen proliferieren deutlich besser als die Leervektor-transfizierte Kontrolle. Dieses Ergebnis bestätigt also das Ergebnis unter 4.3.1.

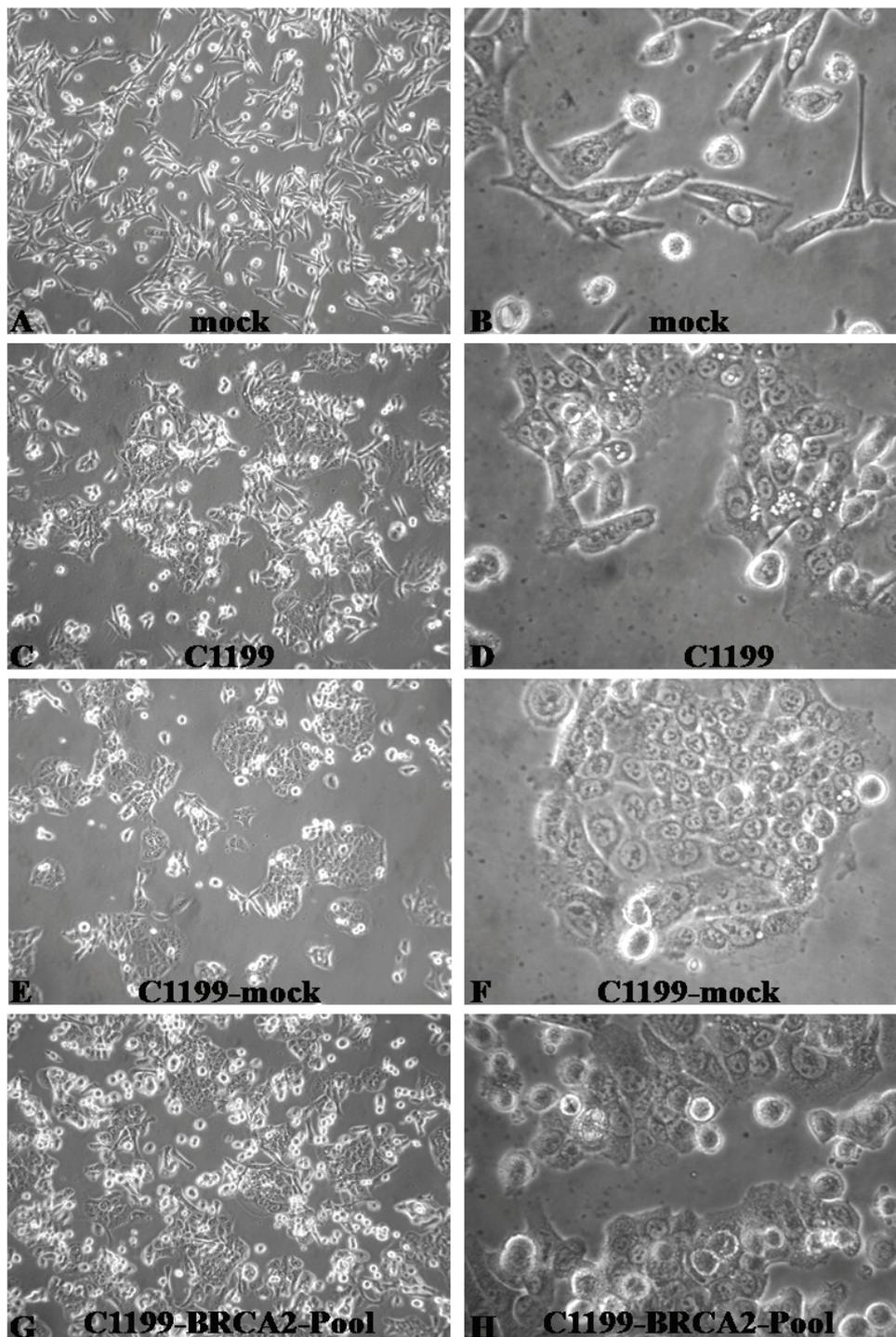


Abbildung 4.3.7.1: Morphologie und Wachstumsmuster von DusCol-1B-Zellen auf unbeschichteten Zellkulturschalen. Abgebildet ist das Wachstumsmuster von DusCol-1B Zellen, die entweder mit dem leeren pLZRS Vektor (mock), C1199-Tiam1 (C1199), C1199-Tiam1 und dem leeren pCL1 Vektor (C1199-mock) oder C1199-Tiam1 und BRCA2 (C1199-Tiam1-BRCA2-Pool) transfiziert wurden, auf unbeschichteten Zellkulturschalen. (Originalvergrößerung: A,C,E,G: x 100; B,D,F,H x 400)

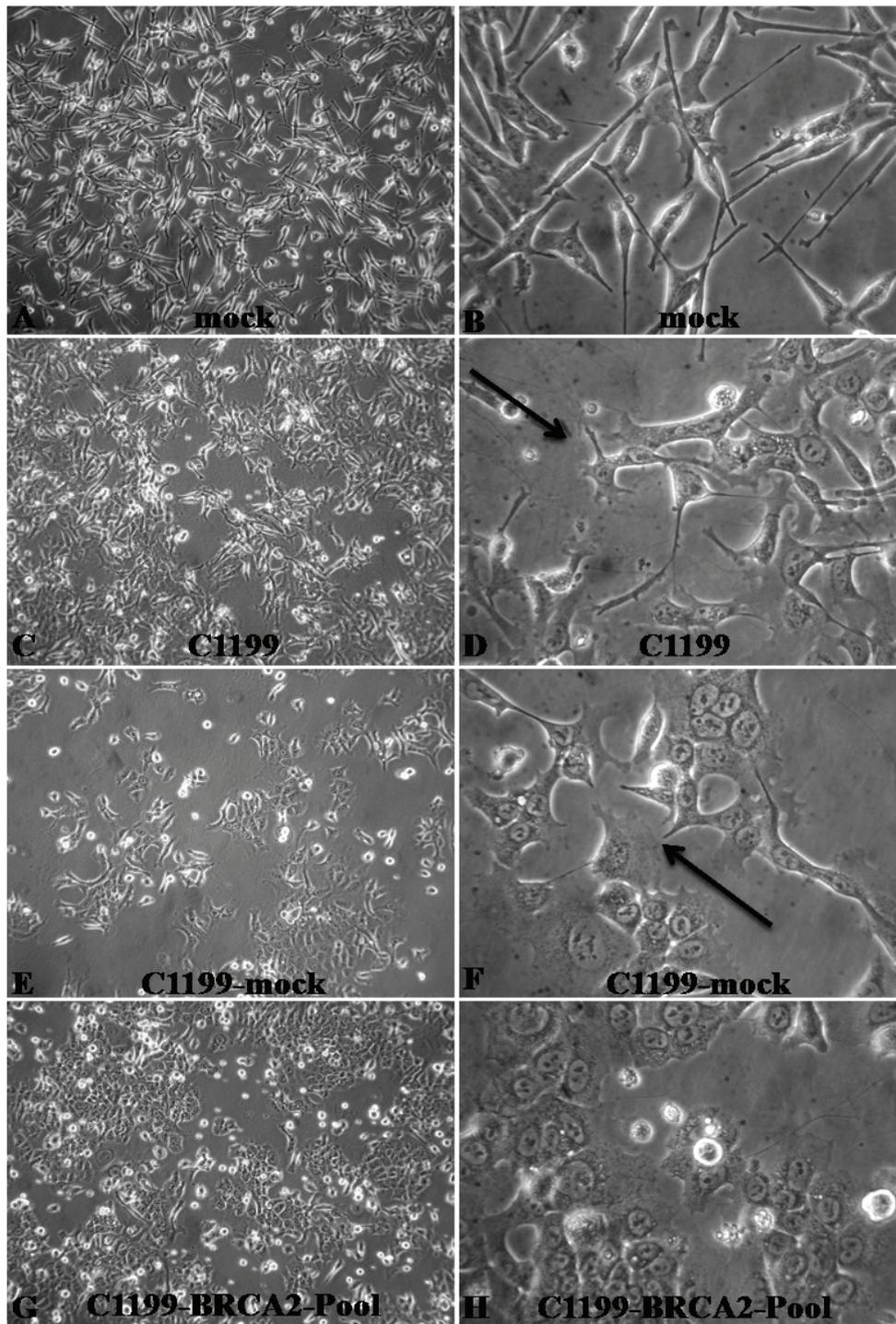


Abbildung 4.3.7.2: Morphologie und Wachstumsmuster der unterschiedlich transfizierten DusCol-1B Zellen auf Kollagen I. Die verschieden transfizierten DusCol-1B Zellen wurden auf Kollagen I, einer Komponente der EZM ausgesät und inkubiert. Die Pfeile zeigen auf die spindelförmigen C1199 und C1199-mock transfizierten DusCol-1B Zellen. (Originalvergrößerung: A,C,E,G: x 100; B,D,F,H x 400)

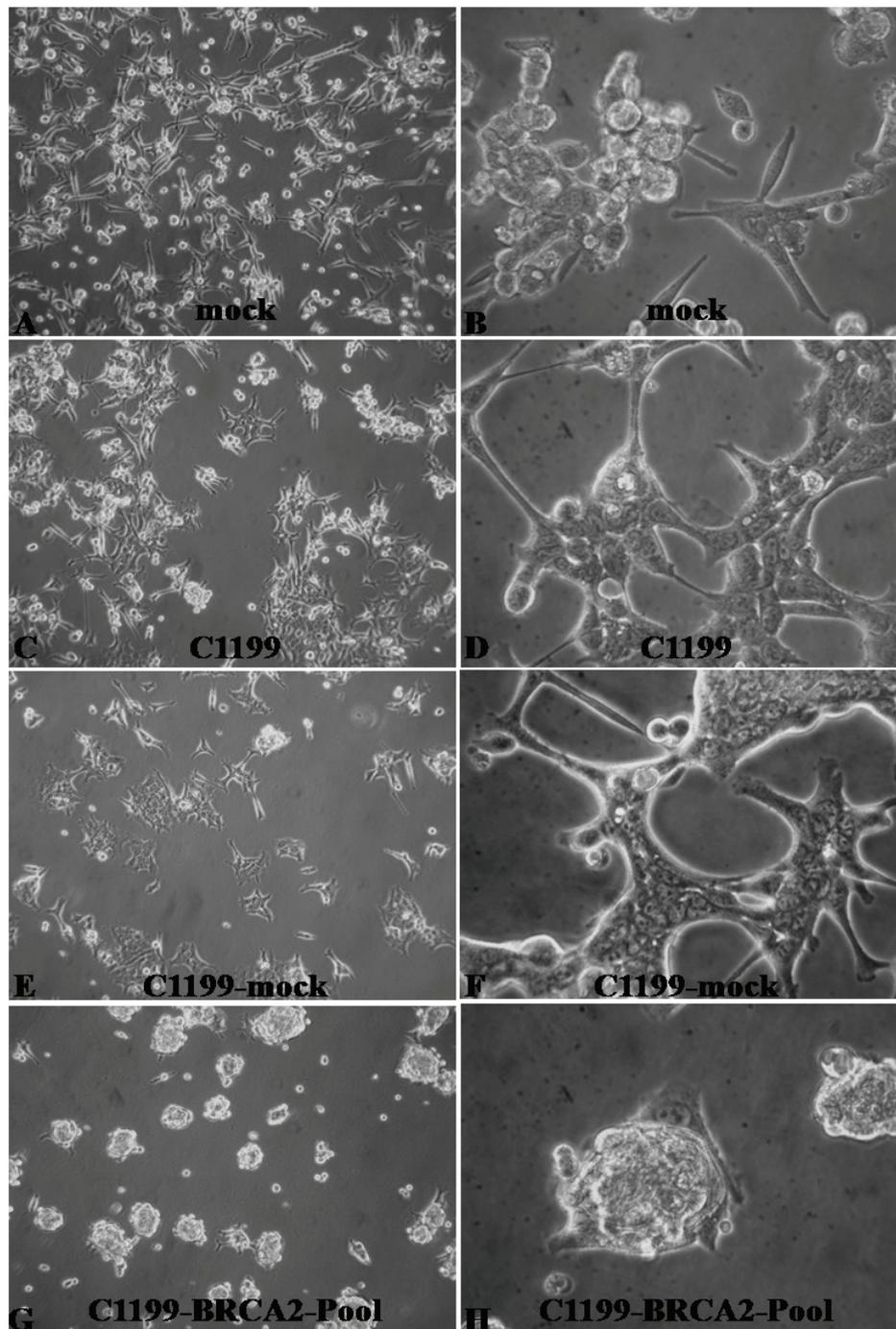


Abbildung 4.3.7.3: Morphologie und Wachstumsmuster der unterschiedlich transfizierten DusCol-1B Zellen auf Laminin. Verschieden transfizierte DusCol-1B Zellen wurden auf Laminin-beschichtenden Zellkulturschalen ausgesät und inkubiert. Das Wachstumsmuster wurde mittels einer Leica-Kamera fotografiert. (Originalvergrößerung: A,C,E,G: x 100; B,D,F,H x 400)

4.3.8 Effekte auf die Expression von β -Catenin

Aufgrund der signifikanten Effekte von C1199-Tiam1 und BRCA2 auf die Zellmigration, stellte sich die Frage nach den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Da C1199-Tiam1 bekanntermaßen zu einer Aktivierung der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion führt (7), wurden bereits in den Voruntersuchungen zu dieser Arbeit die Effekte von C1199-Tiam1 und BRCA2 auf die Proteinexpression von E-Cadherin und β -Catenin im Western Blot untersucht. Dabei hatten weder C1199-Tiam1 noch BRCA2 einen Einfluss auf die Proteinexpression von E-Cadherin und β -Catenin (unveröffentlichte Ergebnisse). Da β -Catenin sowohl an der Zellmembran als auch im Zytosol oder Kern lokalisiert sein kann, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich die intrazelluläre Lokalisation dieser Proteine mittels Immunocytochemischen Färbungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass β -Catenin in mock-transfizierten DusCol-1B Zellen in der gesamten Zelle exprimiert wird, ohne besondere Schwerpunkte in bestimmten zellulären Kompartimenten (siehe Abbildung 4.3.8.1A). Die Kerne der mock transfizierten DusCol-1B Zellen enthalten auch β -Catenin. Bei C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B Zellen konnte eine stärkere Konzentration von β -Catenin an der Zellmembran beobachtet werden, was durch einen Pfeil in Abbildung 4.3.8.1B angedeutet ist. Dies hat zur Folge, dass die β -Catenin-Färbung in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen in der Übersicht mit einer geringeren Vergrößerung, wie ein Wabenmuster aussieht (nicht abgebildet). C1199-Tiam1 transfizierte Zellen enthalten β -Catenin in den Kernen, die intrazelluläre Lokalisation von β -Catenin im Kern wird also nicht durch C1199-Tiam1 beeinflusst. Diese intrazelluläre Konzentration von β -Catenin an der Zellmembran und im Kern konnte auch bei C1199-Tiam1 und leerem Vektor transfizierten DusCol-1B Zellen beobachtet werden (nicht abgebildet). Die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen hatte keinen Einfluss auf die C1199-Tiam1-induzierte intrazelluläre Verschiebung von β -Catenin an die Zellmembran (siehe Abbildung 4.3.8.1C). Im Gegensatz hierzu scheint allerdings die Kernlokalisierung von β -Catenin in diesen Zellen verändert zu sein. Es kann keine klare Kernlokalisierung von β -Catenin in BRCA2 und C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen beobachtet werden. β -Catenin ist in diesen Zellen vielmehr diffus im ganzen Zytosol verteilt, jedoch mit der oben erwähnten Konzentration an der Zellmembran.

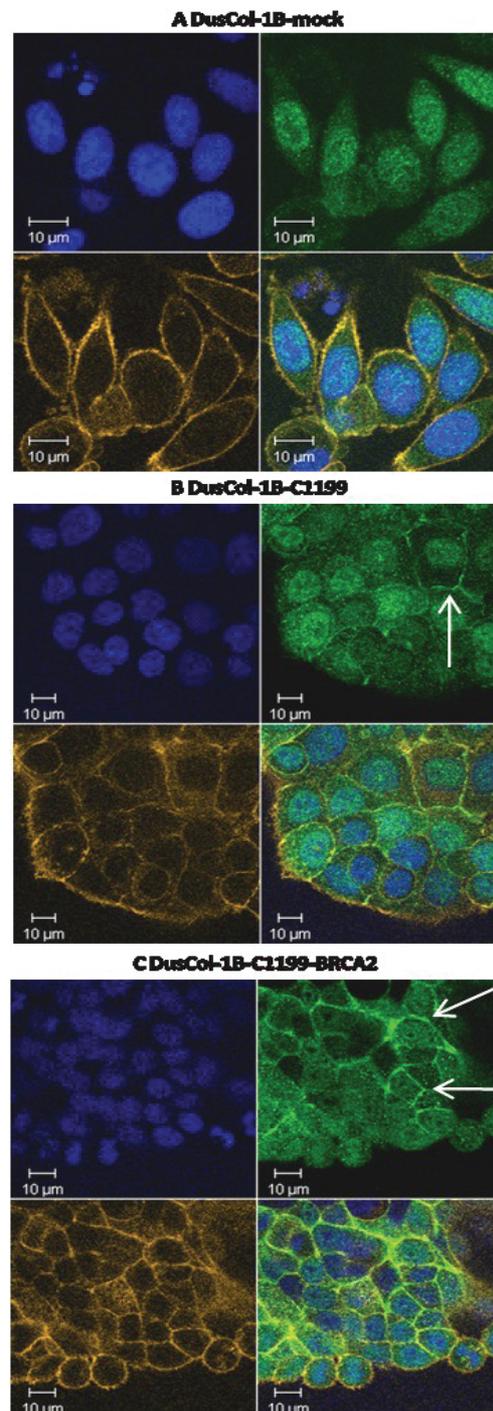


Abbildung 4.3.8.1: Immunfluoreszenzfärbungen gegen Catenin (grün) Phalloidin (orange) und Kerne (blau) in verschiedenen transfizierten DusCol-1B Zellen. Konfokale Aufnahmen der β -Catenin-Expression in verschiedenen transfizierten DusCol-1B Zellen, A pLZRS Leervektor-transfizierte Kontrolle (mock), B C1199-Tiam1 transfizierte Zelllinie (C1199), C C1199-Tiam1 und BRCA2 kotransfizierte Zelllinie (C1199-BRCA2). Grundsätzliche Darstellung pro Quartett: oben links DAPI; oben rechts: β -Catenin (grün); unten links Phalloidin (orange); unten rechts Überlagerung.

4.3.9 Effekte auf das „membrane ruffling“

C1199-Tiam1 führt bekanntermaßen zur Ausbildung der sogenannten „membrane ruffels“ (2). Daher sollte untersucht werden, ob dieser Effekt durch die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen antagonisiert werden kann. Hierfür wurden die verschiedenen transfizierten DusCol-1B Zellen mit Tritc-Phalloidin angefärbt und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie fotodokumentiert. Dies führt zu einer Anfärbung des Zytoskeletts, da das Phalloidin spezifisch an F-Aktin bindet (181).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Michiels et al (2) eine morphologische Transformation der DusCol-1B Zellen nach Transfektion mit C1199-Tiam1. So sind mock-transfizierte DusCol-1B Zellen spindelig und zeigen eine geringgradige Zell-Zelladhäsion, während C1199-Tiam1 transfizierte DusCol-1B Zellen einen epitheloiden „pfannkuchenartigen“ Phänotyp und ein Wachstum in soliden Zellverbänden aufweisen (Abbildung 4.3.9.1). Dieser C1199-Tiam1-induzierte Phänotyp wird durch Co-Transfektion von BRCA2 nicht verändert (siehe Abbildung 4.3.9.1). Ähnliches fand sich auch für das C1199-Tiam1 induzierte membrane ruffling, bei dem es sich um faltenartige Auswerfungen der Zellen handelt, die auf Veränderungen des Aktinzytoskeletts beruhen. C1199-Tiam1 führt zu einer deutlichen Induktion des membrane rufflings. Dieser Effekt lässt sich durch die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen nicht beeinflussen. Oberflächenaufnahmen der angefärbten Zellen verstärken diese Beobachtungen zusätzlich. Die Oberfläche der C1199-Tiam1 und C1199-BRCA2 transfizierten Zellen ist nicht glatt, sondern weist eine deutlich gesteigerte Ausbildung dieser Aktinruffels auf (nicht abgebildet).

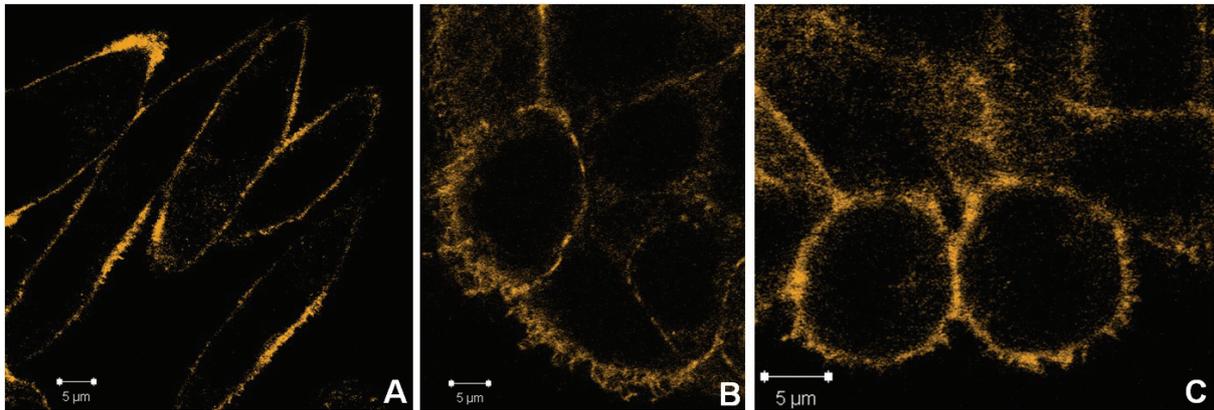


Abbildung 4.3.9.1: Tritc-Phalloidin Färbungen der verschieden transfizierten DusCol-1B-Zellen am konfokalen Mikroskop. A DusCol-1B-mock, B DusCol-1B-C1199, C DusCol-1B-C1199-BRCA2-Pool.

4.3.10 Effekte auf die Invasion im 3D Kollagenassay

Um die kollektive Invasion in den verschiedenen transfizierten DusCol-1B Zellen zu untersuchen, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. P. Friedel (Nijmegen, Niederlande; früher: Würzburg) ein 3D Kollagen-Invasionsassay wie beschrieben durchgeführt (125,126). Dabei zeigte sich, dass die pLZRS Leervektor-transfizierten DusCol-1B-Zellen (mock) innerhalb von acht Tagen nicht in der Lage waren, im dreidimensionalen Kollagengel zu proliferieren. Außerdem zeigten diese Zellen keine nennenswerte Invasivität (Abbildung 4.3.10.1 A+B). Im Gegensatz dazu proliferierten C1199-Tiam1-transfizierte DusCol-1B Zellen sehr gut, was an einer deutlichen Größenzunahme der Sphäroide nach acht Tagen zu erkennen ist. Weiterhin wiesen die Sphäroide der C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B Zellen nach 8 Tagen zahlreiche Verzweigungen und Verästelungen auf, was einer kollektiven Invasion der Tumorzellen in die umgebende Matrix hinein entspricht. Dieser Effekt von C1199-Tiam1 konnte durch die Reexpression von BRCA2 in den C1199-Tiam1 transfizierten Zellen vollständig antagonisiert werden (Abbildung 4.3.10.1G+H). So zeigten die Sphäroide der C1199-Tiam1- und BRCA2-kotransfizierten DusCol-1B Zelleverbände zwar eine Größenzunahme, aber keine invasiven Verästelungen, wie man sie bei C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B Zellen beobachten konnte. Dass dieser Effekt tatsächlich auf BRCA2 zurückzuführen ist und nicht auf den transfizierten Vektor, zeigt die entsprechende Kontrolle DusCol-1B-C1199-mock. Die Sphäroide dieser Zelllinie zeigten das selbe Invasionsverhalten im 3D-Kollagengel wie die Sphäroide der DusCol-1B-C1199 Zellen.

Um heraus zu finden, ob die C1199-Tiam1-induzierte Invasion durch MMPs induziert wird, wurde im Folgenden dieser Assay für DusCol-1B-C1199 Zellen wiederholt, jedoch mit und ohne Einsatz des MMP-Inhibitors GM 6001. Dabei zeigte sich, dass in Gegenwart des MMP-Inhibitors die kollektive Invasion der C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B-Zellen im 3D-Kollagengel vollständig inhibiert wird. Außerdem konnte man beobachten, dass die 2D-Migration in der Grenzzone zwischen den zwei Kollagenlayern, in der auch die Tumorzellsphäroide eingebracht wurden, nicht gehemmt wurde (vgl. Abbildung 4.3.10.2).

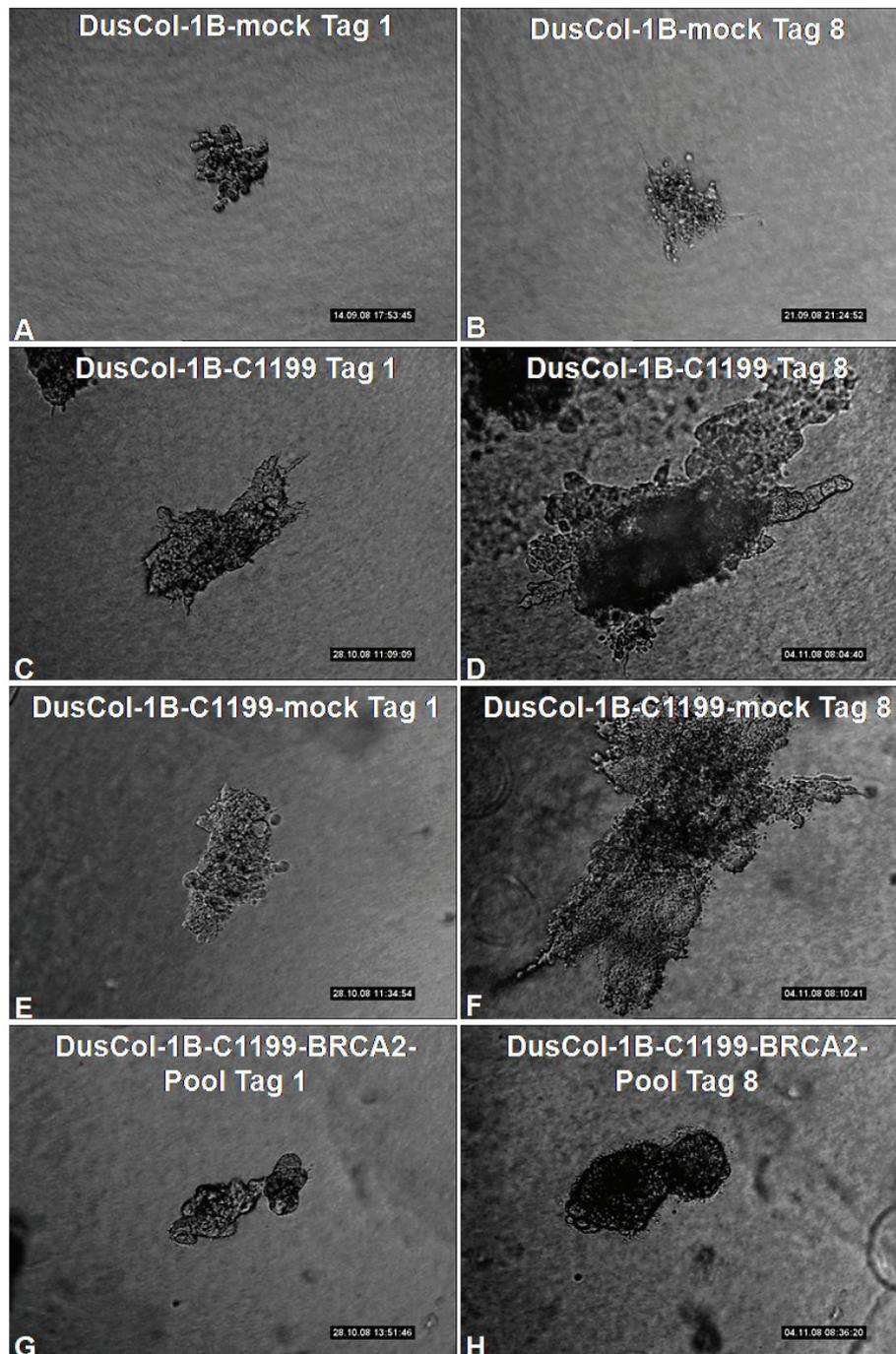


Abbildung 4.3.10.1: Proliferation und kollektive Invasion dreidimensionaler Zellsphäroide in einer 3D-Kollagenmatrix. Dreidimensionale Zellsphäroide der verschiedenen transfizierten DusCol-1B-Zellen wurden in eine 3D-Kollagenmatrix eingebracht und das Invasionsverhalten und die Proliferation dieser Sphäroide über einen Verlauf von 8 Tagen dokumentiert, wobei hier nur der erste und letzte Tag (Tag 8) nach Aussaat der Sphäroide abgebildet sind. Die Dokumentation des Invasionsverhaltens erfolgte mittels „time-lapse videomicroscopy“.

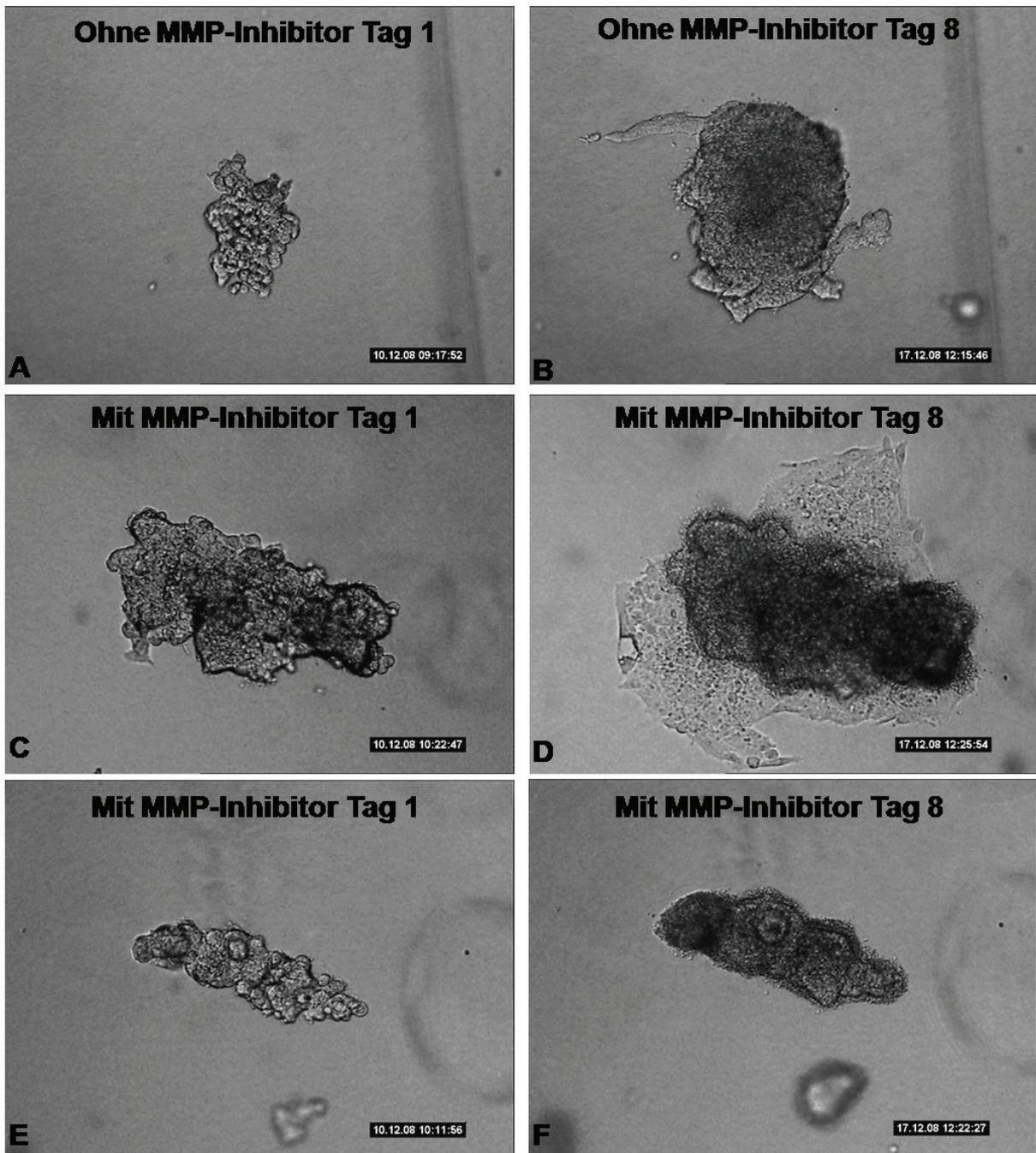


Abbildung 4.3.10.2: Proliferation und kollektive Invasion C1199-Tiam1-transfizierter DusCol-1B-Zellen mit und ohne MMP-Inhibitor. Dreidimensionale Zellsphäroide C1199-Tiam1-transfizierter DusCol-1B-Zellen wurden in eine 3D-Kollagenmatrix eingebracht und das Invasionsverhalten und die Proliferation wurden mittels „time-lapse videomicroscopy“ über einen mehrtägigen Verlauf dokumentiert. Das Invasionsverhalten wurde mit und ohne den MMP-Inhibitor GM6001 untersucht. Abgebildet sind der erste und letzte Tag nach Aussaat der Sphäroide (Tag 1 und Tag 8).

4.3.11 Effekte auf die Sekretion invasionsrelevanter Proteine

Aufgrund der Ergebnisse des 3D-Kollageninvasions-Assays wurde im Folgenden untersucht, ob und wenn ja welche Auswirkungen C1199-Tiam1 und BRCA2 auf die Sekretion der MMPs -2 und -9 haben. In Übereinstimmung mit den erzielten Ergebnissen in Voruntersuchungen zeigte die Untersuchung, dass weder C1199-Tiam1 noch die Reexpression von BRCA2 in Tiam1-transfizierten Zellen einen Einfluss auf die MMP-Sekretion ausüben, wenn die Zellen auf unbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert wurden (Abbildung 4.3.11.1). Daher wurden in Analogie zum 3D-Kollageninvasionsassay die verschiedenen transfizierten DusCol-1B-Zellen auf KollagenI-beschichteten Zellkulturschalen ausgesät, der Zellkulturüberstand aufkonzentriert und die MMP-Sekretion mittels Zymographie untersucht. Dabei zeigte sich, dass C1199-Tiam1 auf Kollagen I zu einer gesteigerten Sekretion der Matrixmetalloproteinasen 9 und Pro-MMP-2 führt (siehe Abbildung 4.3.11.2) und dieser Effekt durch die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen fast vollständig antagonisiert wird.

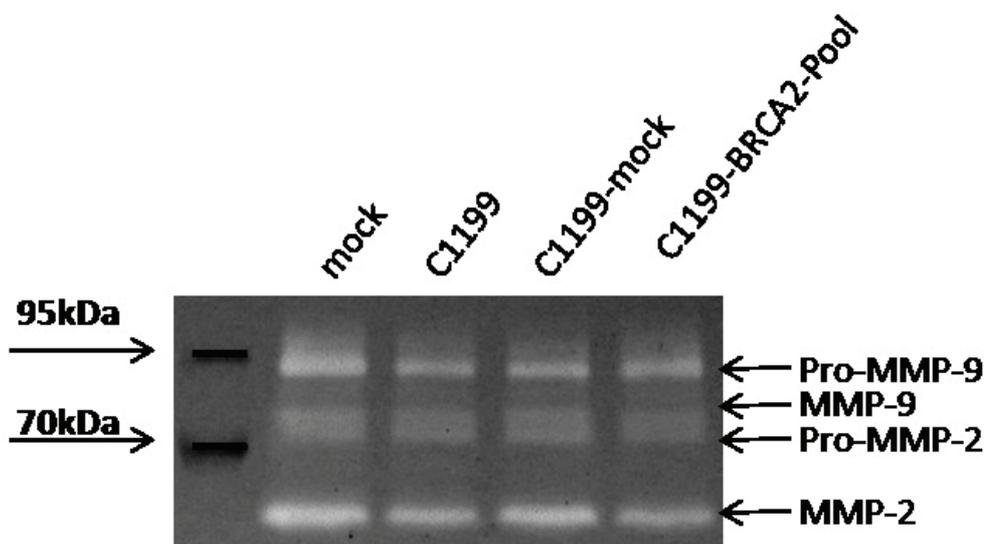


Abbildung 4.3.11.1: Effekt von C1199-Tiam1 (C1199) und BRCA2 auf die Sekretion von MMP-2 und MMP-9. Die Sekretionslevel der MMPs 2 und 9 wurden in aufkonzentrierten serumfreien Kulturüberständen mithilfe der Gelatin-Zymographie bestimmt. Hierfür wurden die Zellen in unbeschichteten Zellkulturschalen ausgesät. Das abgebildete Ergebnis ist repräsentativ für mindestens vier unabhängig voneinander durchgeführte Untersuchungen.

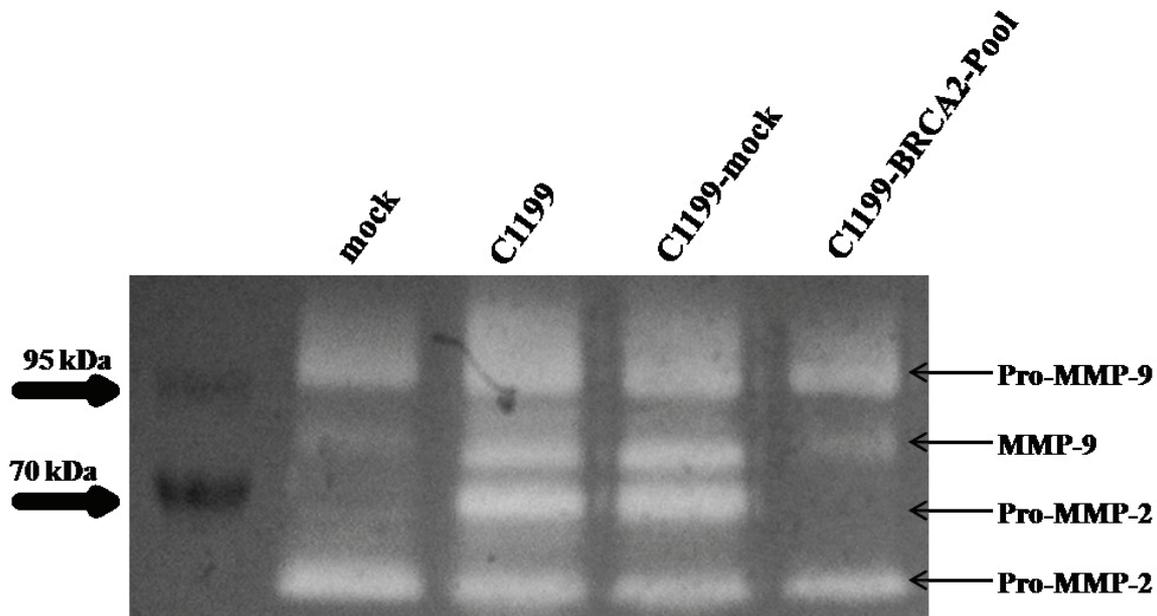


Abbildung 4.3.11.2: Effekt von C1199-Tiam1 (C1199) und BRCA2 auf die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 auf Kollagen I. Die Zellen wurden in Kollagen I-beschichteten Zellkulturschalen ausgesät. Anschließend wurde die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 mittels Gelatin-Zymographie bestimmt. Das abgebildete Ergebnis ist repräsentativ für mindestens vier unabhängig voneinander durchgeführte Untersuchungen.

Im nächsten Schritt wurde dann die Sekretion der spezifischen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (TIMP-1 und TIMP-2) in diesen Zelllinien untersucht. Denn nur die Betrachtung der Expression beider Proteinfamilien ermöglicht es, auf einen invasiven Phänotyp der Zellen zu schließen. Hierbei konnte in Übereinstimmung mit bereits früher durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass Tiam1 auf unbeschichteten Zellkulturschalen zu einer Hochregulation von TIMP-1 und TIMP-2 führt (11). Die Reexpression von BRCA2 in diesen C1199-Tiam1-transfizierten Zelllinien führte zu einer Antagonisierung dieses Tiam1-induzierten Effekts (Abbildung 4.3.11.3).

Bei der Untersuchung der Sekretion der TIMPs auf Kollagen I zeigte sich hingegen, dass TIMP-1 durch C1199-Tiam1 stark herabreguliert wird und dieser Effekt durch die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B-Zellen nahezu vollständig revertiert wird (Abbildung 4.3.11.4). Auch die TIMP-2 Sekretion wurde durch C1199-Tiam1 auf Kollagen I reduziert, allerdings nur geringgradig (siehe Abbildung 4.3.11.4). Auch hier führte die

Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen zu einer Antagonisierung des C1199-Tiam1-induzierten Effekts.

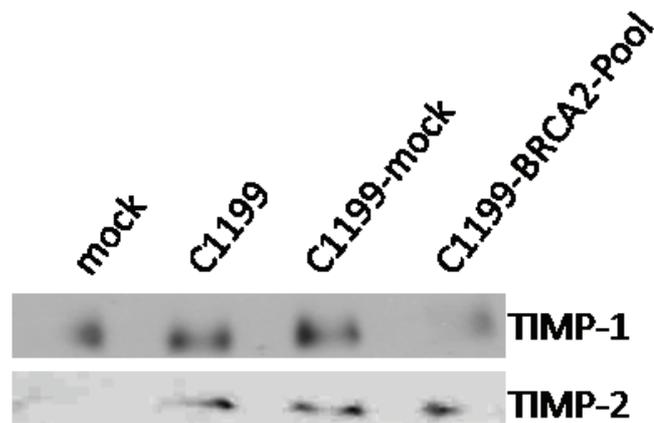


Abbildung 4.3.11.3: Effekte von C1199-Tiam1 (C1199) und BRCA2 auf die Sekretion von TIMP-1 und TIMP2. Die Sekretion der TIMPs in den verschiedenen transfizierten DusCol-1B Zelllinien wurde mithilfe aufkonzentrierter serumfreier Kulturüberstände im Western Blot untersucht. Hierfür wurden die Zellen auf unbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Das abgebildete Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

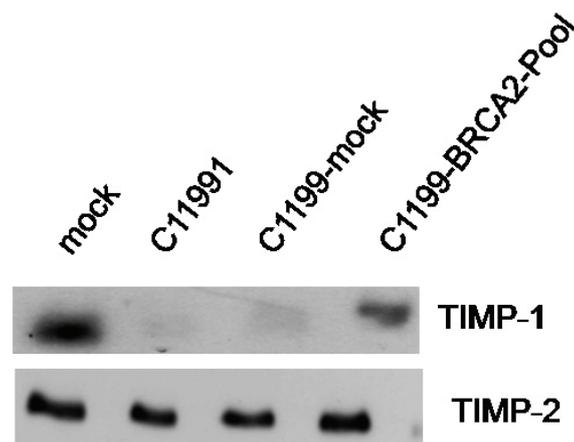


Abbildung 4.3.11.4: Effekte von C1199-Tiam1 (C1199) und BRCA2 auf die Sekretion von TIMP-1 und TIMP2 auf Kollagen I. Die verschiedenen transfizierten DusCol-1B Zelllinien wurden auf Kollagen I beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Anschließend wurde die TIMP-1 und TIMP-2 Sekretion mithilfe aufkonzentrierter serumfreier Kulturüberstände im Western Blot untersucht. Das abgebildete Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

4.4 Wie wird die Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 vermittelt

Um herauszufinden, durch welchen Signalweg die Tiam1-induzierte Herabregulation der BRCA2-Expression vermittelt wird, wurden die folgenden Fragestellungen untersucht:

1. Über welche Signalwege „downstream“ von Rac erfolgt die Beeinflussung der Expression von BRCA2?
2. Ist die Tiam1-induzierte BRCA2-Herabregulation abhängig von der Tiam1-induzierten E-Cadherin-vermittelten Zellzelladhäsion?
3. Sind aus der Literatur bekannte BRCA2-Repressoren in die C1199-Tiam1-induzierte Expressionshemmung von BRCA2 involviert?

4.4.1: Über welche Signalwege „downstream“ von Rac erfolgt die Beeinflussung der Expression von BRCA2?

Wie oben ausgeführt existieren mehrere Signalwege „downstream“ von Rac, die bekanntermaßen alle in der Lage sind, die Transkription von Genen zu beeinflussen. Um herauszufinden, über welche dieser Signalwege die Beeinflussung der Expression von BRCA2 durch Tiam1 erfolgt, wurden die stabil mit C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B und BPH-1-Zelllinien mit selektiven Inhibitoren des ERK-Signalwegs (PD98059 und U0126) (93,94), des p38-Signalwegs (SB203580) (96), des ROS-Signalwegs (Catalase) (97), des JNK-Signalwegs (SP600125) (95) und des Phosphatidylinositol-3Kinase-Signalwegs (LY294002, Wortmannin) (98,99) inkubiert. Als Kontrollen dienten das für die Lösung der Substanzen verwendete Lösungsmittel DMSO, hitzeinaktivierte Catalase sowie die nicht behandelten mock- bzw. C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B und BPH-1-Zellen. Die Effekte der verschiedenen Inhibitoren auf die C1199-Tiam1-induzierte Expressionshemmung von BRCA2 wurden dann auf RNA-Ebene mittels LightCycler untersucht. Die Bestimmung der BRCA2 Expression erfolgte relativ zur Expression des Haushaltsgens GAPDH.

Dabei zeigte sich zunächst, dass C1199-Tiam1 zu einer ca. 40%igen Reduktion der BRCA2-Expression im Vergleich zum Leervektor (mock) führt (siehe Abbildung 4.4.1.1). DMSO hatte keinen Einfluss auf die C1199-induzierte Herabregulation von BRCA2. Ebenso waren die beiden ERK-Inhibitoren PD98059 und U0126 nicht in der Lage, die C1199-Tiam1-vermittelte

Herabregulation von BRCA2 zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu bewirkte der Einsatz der Inhibitoren SB203580, Wortmannin, LY294002 und SP600125 eine Revertierung der C1199-induzierten Herabregulation von BRCA2 in DusCol-1B-Zellen (Abbildung 4.4.1.1). Zum Einfluss der Catalase auf die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 kann keine abschließende Stellung genommen werden, da auch bei mehrfacher Wiederholung des Versuchs, die hitzeinaktivierte Catalase, die durch 30 minütige Inkubation in einem 100°C warmen Wasserbad inaktiviert wurde, wie die Catalase ebenfalls einen Effekt zeigte.

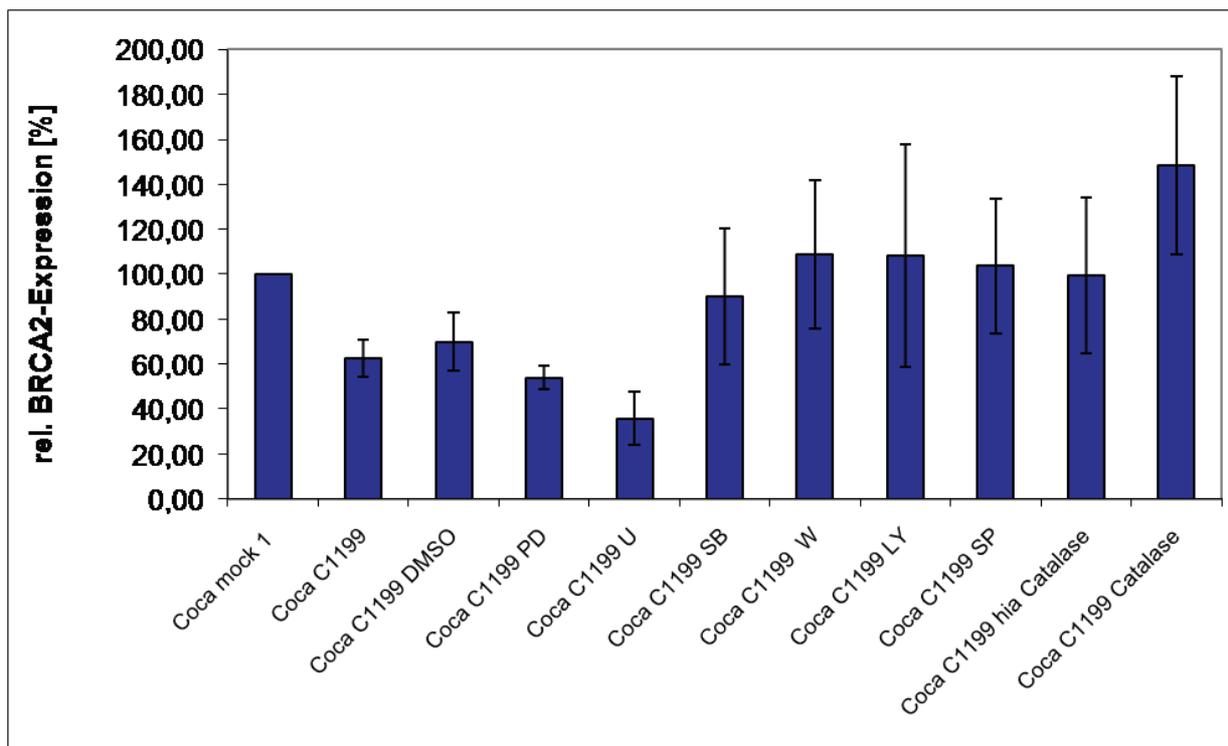


Abbildung 4.4.1.1: Effekte verschiedener Inhibitoren auf die BRCA2-Expression in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen. Stabil mit C1199-Tiam1-transfizierte DusCol-1B-Zellen wurden mit verschiedenen Inhibitoren für 24 Stunden behandelt. Folgende Inhibitoren wurden eingesetzt: PD98059 (PD) 25 μ M, U0126 (U) 10 μ M, SB203580 (SB) 10 μ M, Catalase (1mg/ml), SP600125 (SP) 10 μ M, LY294002 (LY) 10 μ M und Wortmannin (W) 20nM. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten LightCycler Untersuchungen.

Bei der selektiven Blockierung der verschiedenen Signalwege in BPH-1 Zellen zeigte sich, dass die Expression von BRCA2 auf RNA-Ebene auch in BPH-Zellen durch C1199-Tiam1 um ca. 40% reduziert wird. Auch hier wurde der C1199-Tiam1-Effekt durch selektive Inhibition des JNK-Signalwegs antagonisiert (Abbildung 4.4.1.2). Ebenso führte die Inhibition des ROS-Signalwegs zur Revertierung des Effekts von C1199-Tiam1. Im Gegensatz zu den

Beobachtungen in DusCol-1B-Zellen waren jedoch die Inhibitoren der ERK-, p38- und PI3K-Signalwege nicht in der Lage, die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 zu beeinflussen. Dass dieser Effekt tatsächlich auf die beiden Inhibitoren allein zurückzuführen ist, zeigen die jeweiligen Kontrollen. Der JNK-Inhibitor ist in DMSO gelöst, DMSO allein wiederum hatte keinen Einfluss auf die BRCA2-Expression in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen im Vergleich zur unbehandelten C1199-Tiam1 Kontrolle. Ebenso hatte auch die hitzeinaktivierte Catalase (hia Catalase) keinen Einfluss auf die BRCA2-Expression verglichen mit der unbehandelten Kontrolle C1199-Tiam1 (Abbildung 4.4.1.2).

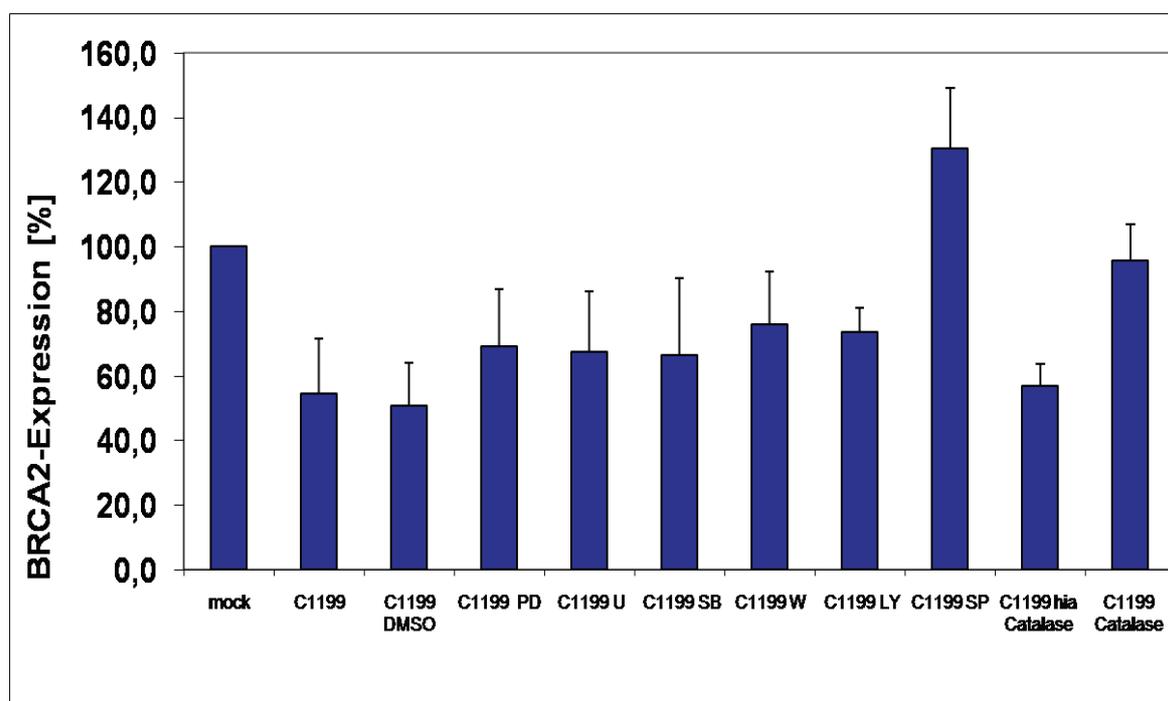


Abbildung 4.4.1.2: Effekte verschiedener Inhibitoren auf die BRCA2-Expression in C1199-Tiam1 transfizierten benignen Prostataepithelzellen BPH-1. Hier wurden die stabil mit C1199-Tiam1 transfizierten BPH-1 Zellen mit selektiven Inhibitoren PD98059 (PD (25µM)), U0126 (U) 10µM, SB203580 (SB) 10µM, Catalase 1mg/ml, SP600125 (SP) 10µM, LY294002 (LY) 10µM und Wortmannin (W) 20nM für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrollen diente das Lösemittel DMSO, hitzeinaktivierte Catalase (hia Catalase) 1mg/ml und nicht behandelte mock- bzw. C1199-Tiam1-transfizierten BPH-1 Zellen. Die Untersuchung erfolgte mittels LightCycler. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens 3 voneinander unabhängig durchgeführten Untersuchungen. Die BRCA2-Expression wurde normalisiert gegen GAPDH.

Im nächsten Schritt wurde die Dosisabhängigkeit der Effekte der Inhibitoren des JNK-Signalwegs (SP600125) und des ROS Signalwegs (Catalase) auf die C1199-Tiam1-vermittelte BRCA2-Expressionshemmung in BPH-1-Zellen mittels LightCycler untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl der JNK-Inhibitor in einem Spektrum von 0,1-10 μ M als auch die Catalase in einem Spektrum von 0,1-1mg/ml zu einer vollständigen Revertierung der C1199-Tiam1-vermittelten BRCA2-Herabregulation führt (Abbildung 4.4.1.3), was die Spezifität dieser Effekte unterstreicht.

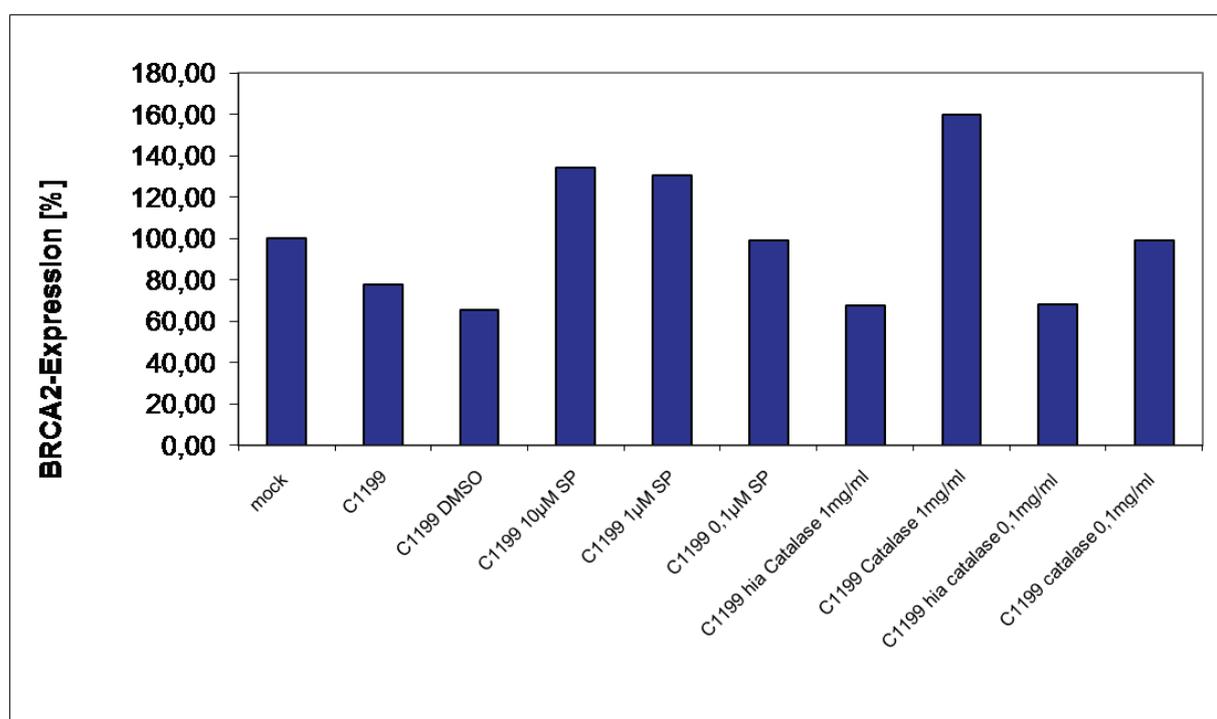


Abbildung 4.4.1.3: Dosis-abhängige Effekte des JNK-Inhibitors und des ROS-Inhibitors Catalase auf die BRCA2-Expression in C1199-Tiam1-transfizierten BPH-1 Zellen. Stabil mit C1199-Tiam1 transfizierte BPH-1-Zellen, wurden mit verschiedenen Konzentrationen der selektiven Inhibitoren des JNK-Signalwegs (SP) und des ROS-Signalwegs (Catalase) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die relative BRCA2-Expression mittels LightCycler bestimmt und gegen GAPDH normalisiert. Abgebildet ist das Ergebnis eines Versuchsansatzes, dessen Messung in einer Doppelbestimmung erfolgte. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Versuchsansätze.

4.4.2 Ist die Tiam1-induzierte BRCA2-Herabregulation abhängig von der Tiam1-induzierten E-Cadherin-vermittelten Zellzelladhäsion?

Hier wurde untersucht, ob die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 abhängig von der Tiam1-induzierten E-Cadherin-vermittelten Zellzelladhäsion ist. Tiam1 führt bekanntlich zu einer Aktivierung der E-Cadherin-vermittelten Zellzelladhäsion, wobei diese Kalzium abhängig ist (16). Deshalb wurden DusCol-1B- und BPH-Zellen, die entweder mit dem leeren Vektor (mock) oder C1199-Tiam1 (C1199) transfiziert worden waren, im Kalzium-armen Medium (0,02mM CaCl₂) kultiviert. Nach einer Synchronisation durch Serumentzug wurde die BRCA2-Expression in diesen Zellen untersucht (Abbildung 4.4.2.1).

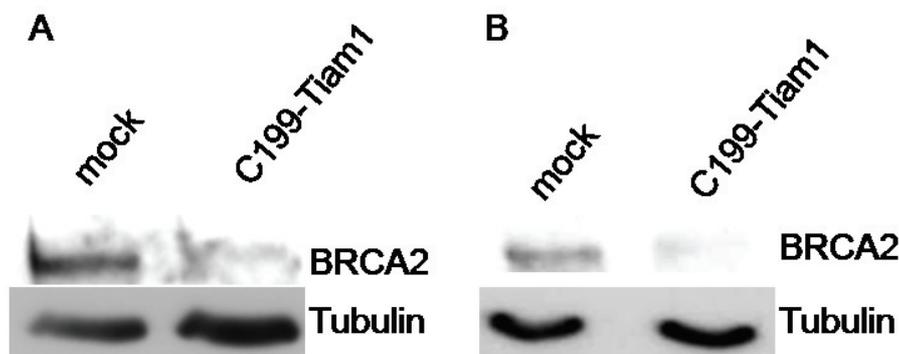


Abbildung 4.4.2.1: BRCA2-Expression in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen unter Kalzium-armen Zellkulturbedingungen. A) humane Kolonkarzinomzellen DusCol-1B B) benigne Prostataepithelzelllinie BPH-1. Die BRCA2-Expressionsuntersuchung erfolgte im Western Blot. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Das Ergebnis ist repräsentativ für mindestens zwei voneinander unabhängig durchgeführte Untersuchungen.

Die Expressionsuntersuchung im Western Blot ergab, dass BRCA2 auch unter Kalzium-Mangel durch C1199-Tiam1 herabreguliert wird. Somit dürfte die C1199-Tiam1-vermittelte BRCA2-Herabregulation unabhängig von der Ausbildung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Kontakte erfolgen.

4.4.3: Sind aus der Literatur bekannte BRCA2-Repressoren in die C1199-Tiam1-induzierte Expressionshemmung von BRCA2 involviert?

Aus der Literatur sind 3 verschiedenen Repressoren von BRCA2 bekannt: Slug, Skp2 und Parp (91,92,136). Daher wurde mittels Western Blot untersucht, ob C1199-Tiam1 die Expression

dieser Proteine beeinflusst. Dabei haben sich jedoch keine nennenswerten Effekte von C1199-Tiam1 auf die Expression dieser Proteine nachweisen lassen (Abbildung 4.4.3.1).

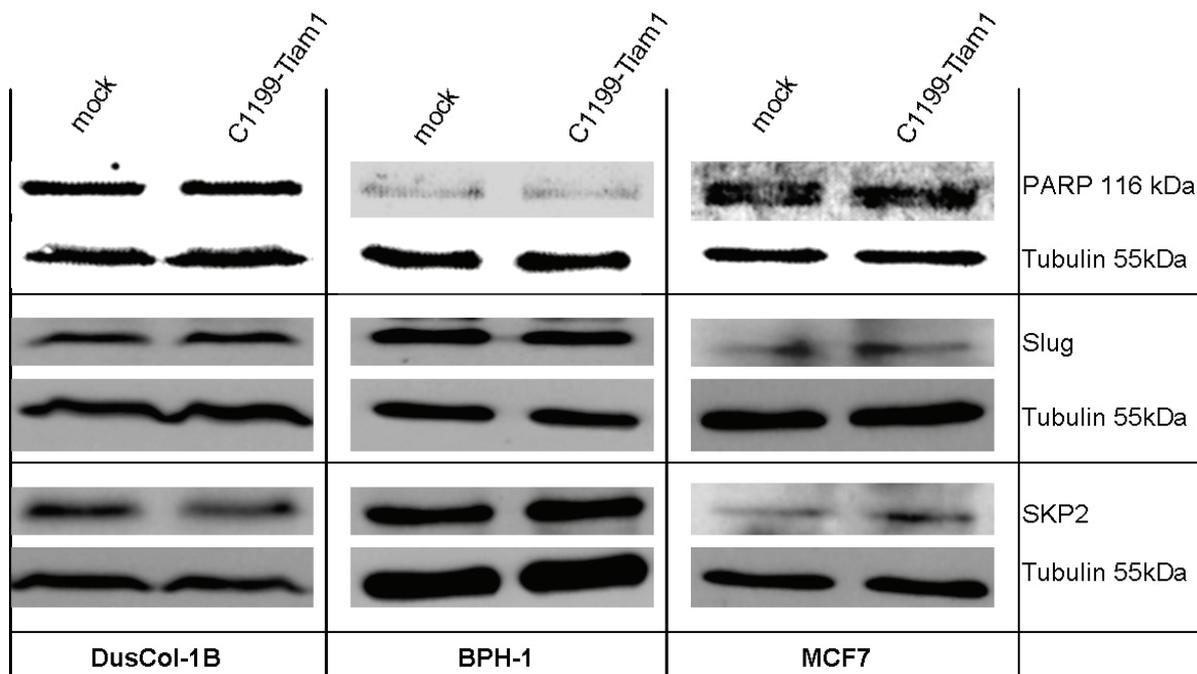


Abbildung 4.4.3.1: Effekte von C1199-Tiam1 auf die Expression von PARP, Slug und SKP2. Die Expressionsuntersuchung der verschiedenen Proteine erfolgte im Western Blot in mock und C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen, BPH-1 Zellen und MCF-7 Zellen. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Untersuchungen.

Da aufgrund dieser Ergebnisse aber nicht auszuschließen war, dass die C1199-Tiam1 induzierte BRCA2-Herabregulation auf einer C1199-Tiam1-induzierten intrazellulären Translokation eines oder mehrerer dieser Proteine vom Zytoplasma in den Kern basiert, ohne das das Expressionslevel beeinflusst wird, wurden zur Klärung dieses Aspekts immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Eine intrazelluläre Verschiebung von Slug und Skp2 wurde in der Literatur bereits beschrieben (140-142), für Parp ist dies nicht bekannt, daher wurde diese Untersuchung auf Skp2 und Slug beschränkt. Dabei zeigte sich sowohl für Slug (Abbildung 4.4.3.2) als auch für Skp2 (Abbildung 4.4.3.3), dass die Proteine in mock-transfizierten DusCol-1B-Zellen im Kern lokalisiert sind und die Expression

von C1199-Tiam1 die intrazelluläre Lokalisation von Slug und Skp2 nicht beeinflusst. Diese Befunde waren nicht nur in DusCol-1B-Zellen, sondern auch in BPH-1 Zellen zu erkennen.

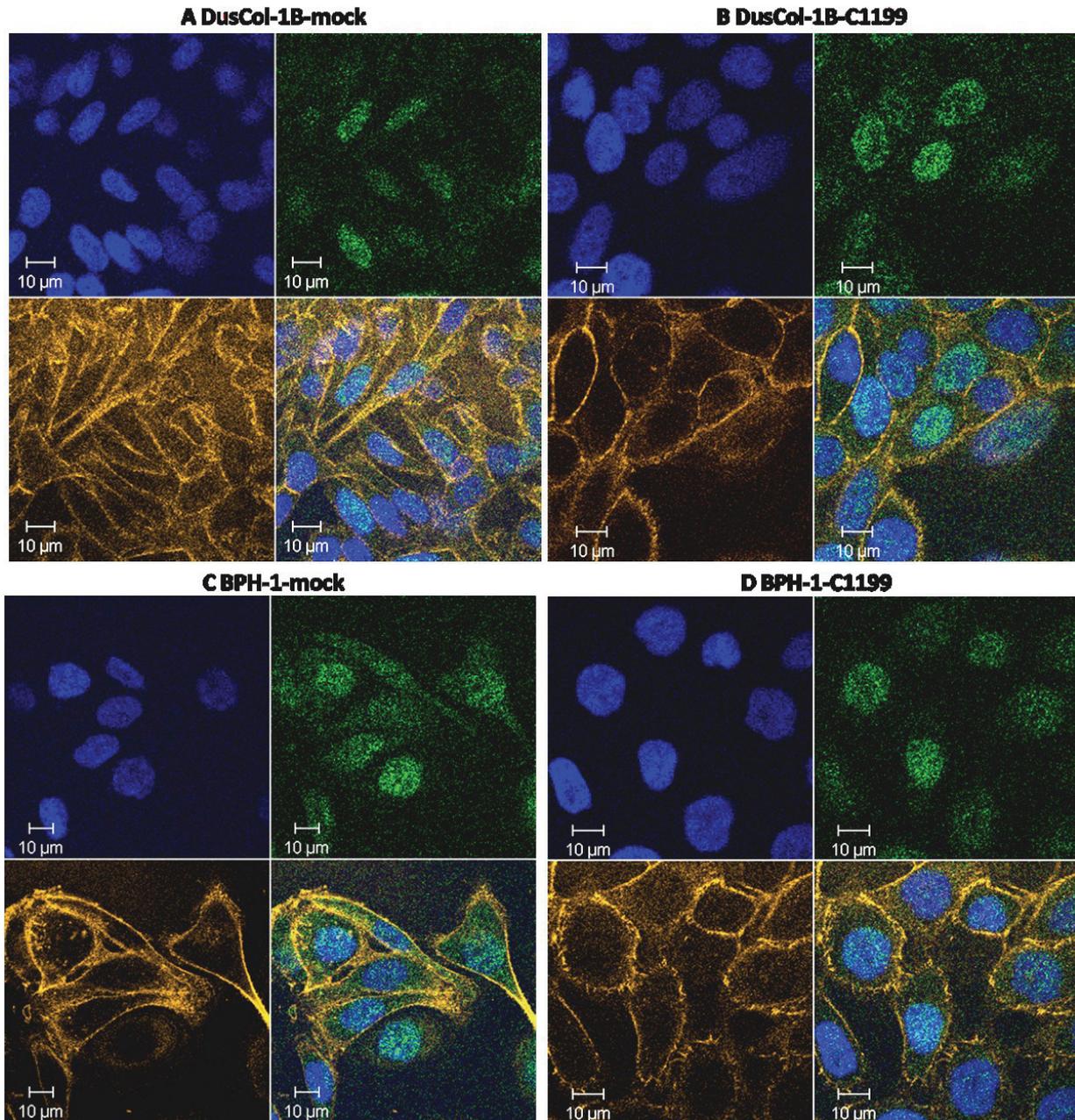


Abbildung 4.4.3.2: Immunfluoreszenzfärbungen zur Darstellung von Slug (grün), des Aktinzytoskeletts (orange) und Kerne (blau) mit entsprechenden Antikörpern (Slug), Tritcmarkiertem Phalloidin (Aktinzytoskelett) und DAPI (Kerne) in transfizierten DusCol-1B und BPH-1 Zellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Grundsätzliche Darstellung pro Quartett: oben links DAPI; oben rechts: Slug (grün); unten links Phalloidin (orange); unten rechts Überlagerung.

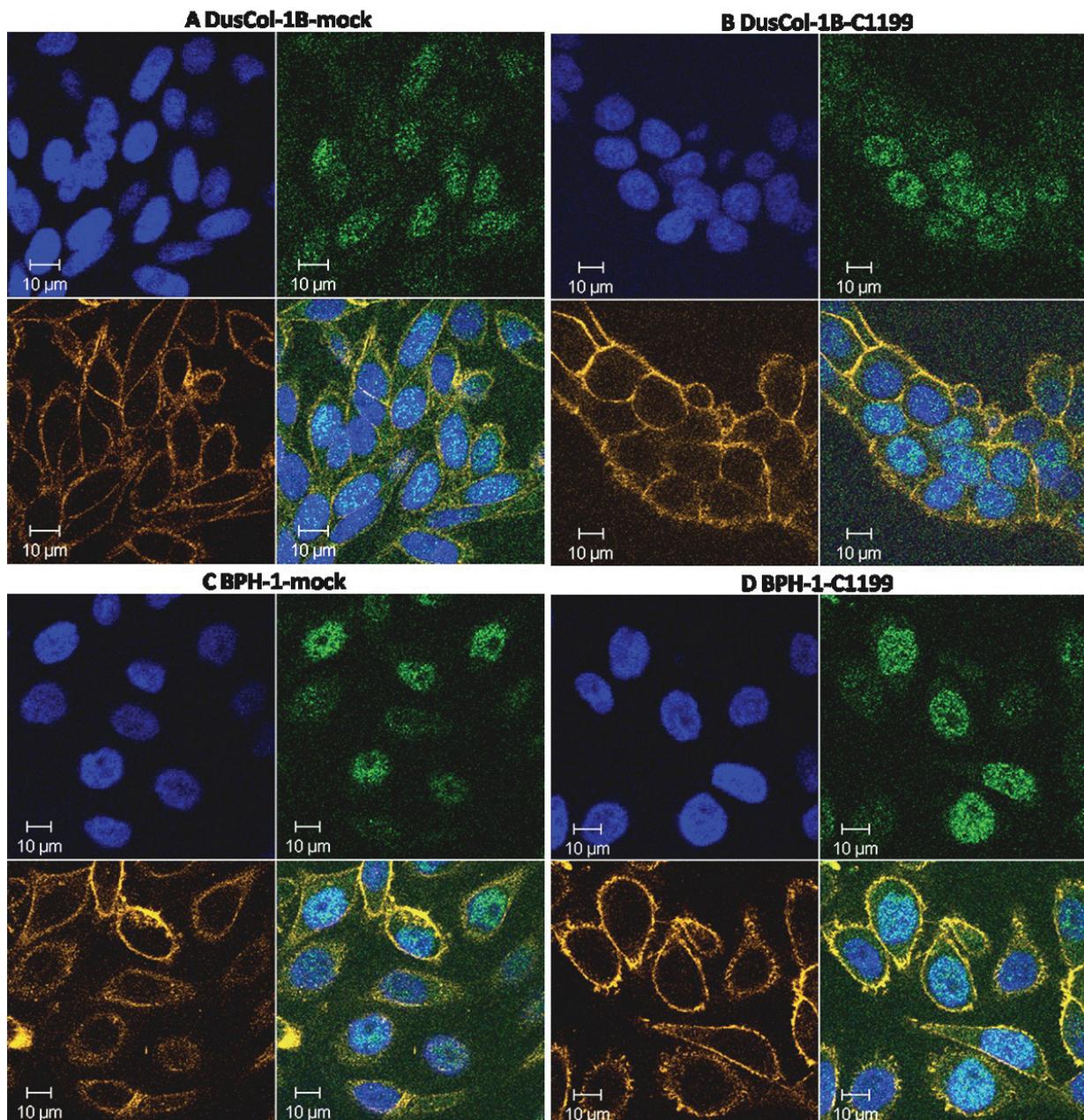


Abbildung 4.4.3.3: Immunfluoreszenzfarbungen zur Darstellung von Skp2 (grün), des Aktinzytoskeletts (orange) und Kerne (blau) mit entsprechenden Antikörpern (Skp2), Tritic-markiertem Phalloidin (Aktinzytoskelett) und DAPI (Kerne) in transfizierten **DusCol-1B** und **BPH-1**. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Grundsätzliche Darstellung pro Quartett: oben links DAPI; oben rechts: Skp2 (grün); unten links Phalloidin (orange); unten rechts Überlagerung.

4.5 Lässt sich die in der Zellkultur nachgewiesene inverse Beziehung zwischen der Expression von Tiam1 und der Expression von BRCA2 in vivo überprüfen?

Um zu überprüfen, ob die beobachtete inverse Beziehung zwischen der Tiam1- und BRCA2-Expression auch *in vivo* ein Korrelat findet, wurde die BRCA2-Expression in Prostata-Tumorproben unseres Kollektivs untersucht. In früheren Untersuchungen an diesem Kollektiv konnte die Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass Tiam1 in mehr als 90% aller Prostatakarzinome gegenüber dem Normalgewebe, signifikant stärker auf Proteinebene exprimiert wird (29). Hierzu wurde zunächst exemplarisch aus 6 Tumorproben und den entsprechenden Normalgeweben RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend die BRCA2-Expression mittels LightCycler untersucht (Abbildung 4.5.1). Die Genexpression wurde zunächst gegen GAPDH und APRT1 bestimmt, da bekannt ist, dass manche geschlechtsspezifische Gewebe chromosomale Veränderungen von Chromosom 12 aufweisen können, welche auch den GAPDH locus betreffen können (138). Da aber beide Genexpressionsuntersuchungen dasselbe Ergebnis erbrachten (nicht abgebildet), wurde im Folgenden nur mit GAPDH gearbeitet.

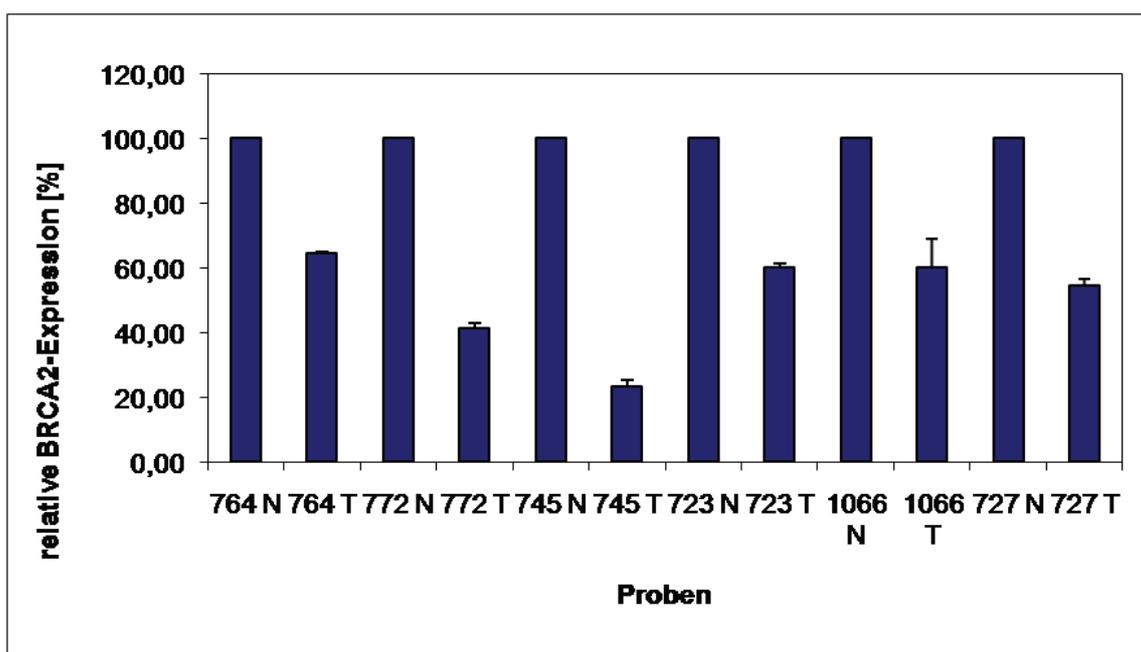


Abbildung 4.5.1: Untersuchung der BRCA2-Expression in verschiedenen Prostatakarzinomen und den jeweils korrespondierenden Normalgeweben. BRCA2-Expression wurde gegen die GAPDH-Expression normalisiert, die Untersuchung erfolgte in einer Doppelbestimmung. T = Tumorgewebe; N = Normalgewebe

Die Untersuchung ergab, dass BRCA2 in allen der 6 untersuchten Tumorproben eine deutliche Reduktion (sogar bis zu 80%) der Expression aufweist im Vergleich zum Normalgewebe (vgl. Abbildung 4.5.1). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der von uns beobachtete Effekt der BRCA2- und Tiam1- Korrelation auch *in vivo* relevant ist, hierzu sind jedoch noch weiterführende Untersuchungen so z.B. mittels semiquantitativer Immunhistochemie nötig.

4.6 Hat Tiam1 auch ein Einfluss auf die Expression von BRCA1?

Da BRCA2 und BRCA1 zum Teil überlappende Funktionen haben und vermutet wird, dass beide Proteine möglicherweise sogar über denselben Signalweg reguliert werden, wurde in verschiedenen Zelllinien untersucht, ob auch die BRCA1-Expression durch C1199-Tiam1 beeinflusst wird. Dabei zeigte sich, dass C1199-Tiam1 sowohl in DusCol-1B-Zellen als auch in BPH-1, MCF-7 und LNCaP-Zellen zu einer deutlichen Expressionshemmung von BRCA1 führt (Abbildung 4.6.1). Dies deutet darauf hin, dass es sich nicht um einen zelllinienspezifischen Effekt handelt, sondern um einen übergeordneten Mechanismus, der in verschiedenen Zellsystemen Gültigkeit zu haben scheint.

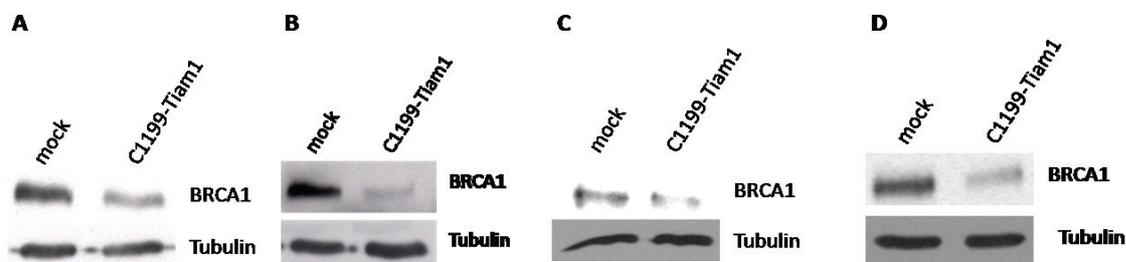


Abbildung 4.6.1: C1199-Tiam1-induzierte Expressionshemmung von BRCA1 in verschiedenen stabil transfizierten humanen epithelialen Zelllinien.

A) Kolonkarzinomzelllinie DusCol-1B, B) benigne Prostataepithelzelllinie BPH-1, C) Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und D) Prostatakarzinomzelllinie LNCaP. Der Nachweis von BRCA1 erfolgte im Western Blot. Die Expression von α -Tubulin diene als Ladekontrolle. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Nachdem in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von C1199-Tiam1 zu einer Herabregulation von BRCA1 führt, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob umgekehrt der Knockdown von Tiam1 mittels Tiam1-spezifischer sh-RNA zu einer Hochregulation von BRCA1 führt. Hierzu wurde die BRCA1 Expression in stabil mit sh-Tiam1-transfizierten DusCol-1B-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass das BRCA1-Expressionslevel steigt, wenn die Tiam1-Expression mittels sh-RNA reduziert wird (Abbildung 4.6.2).

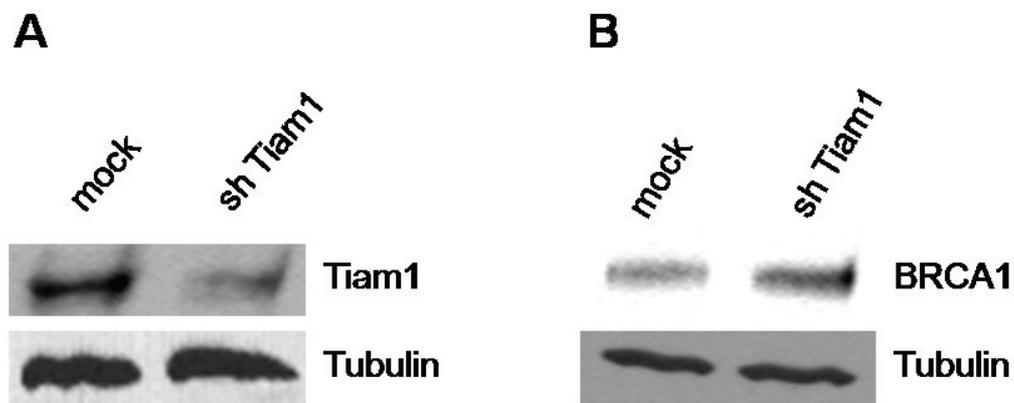


Abbildung 4.6.2: Effekt des Tiam1-Knockdowns auf die Expression von BRCA1 in DusCol-1B-Zellen. A Verminderte Tiam1-Expression in DusCol-1B Zellen nach stabiler Transfektion mit sh-RNA für Tiam1 (sh-Tiam1) im Vergleich zum leeren Vektor (mock). B BRCA1 Expression in diesen Zellen. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Western Blot. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Das Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Untersuchungen.

Um zu klären, über welchen Signalweg die C1199-Tiam1-vermittelte Herabregulation von BRCA1 verläuft, wurde als erstes untersucht, ob dieser Effekt abhängig von der C1199-Tiam1-induzierten Ausbildung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zellkontakte ist. Hierzu wurden in Analogie zu den Untersuchungen zu BRCA2, mock- und C1199-Tiam1-transfizierte DusCol-1B- und BPH-1-Zellen in Kalziumfreiem Medium (0,02mM) kultiviert und die BRCA1 Expression nach Synchronisation untersucht (Abbildung 4.6.3).

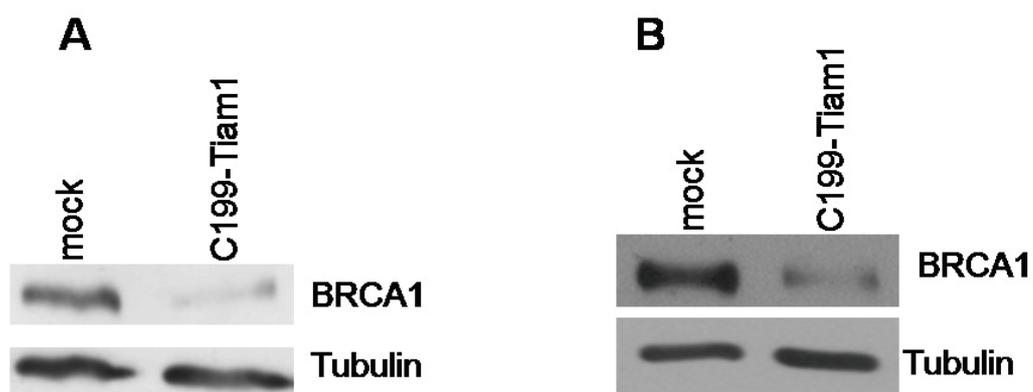


Abbildung 4.6.3: BRCA1-Expression in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen unter Kalzium-Entzug. A) humane Kolonkarzinomzellen DusCol-1B B) benigne Prostataepithelzelllinie BPH-1. Die BRCA1-Expressionsuntersuchung erfolgte im Western Blot. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Das Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführte Untersuchungen.

Dabei zeigte sich, dass BRCA1 auch unter Kalzium-Mangel durch C1199-Tiam1 herabreguliert wird und somit die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA1 unabhängig von der C1199-Tiam1-induzierten Etablierung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Kontakte verlaufen dürfte.

Um die Rolle von ERK, ROS, JNK, p38 und PI3K in der C1199-Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA1 zu untersuchen, wurden diese Signalwege wie unter 4.4.3 beschrieben selektiv blockiert. Hierfür wurden stabil mit C1199-Tiam1-transfizierte DusCol-1B- und BPH-1-Zellen mit verschiedenen Inhibitoren der oben genannten Signalwege für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Effekt der eingesetzten Inhibitoren auf die BRCA1-Expression untersucht. Die Untersuchung erfolgte mittels LightCycler, wobei die BRCA1-Expression immer gegen die GAPDH-Expression normalisiert wurde.

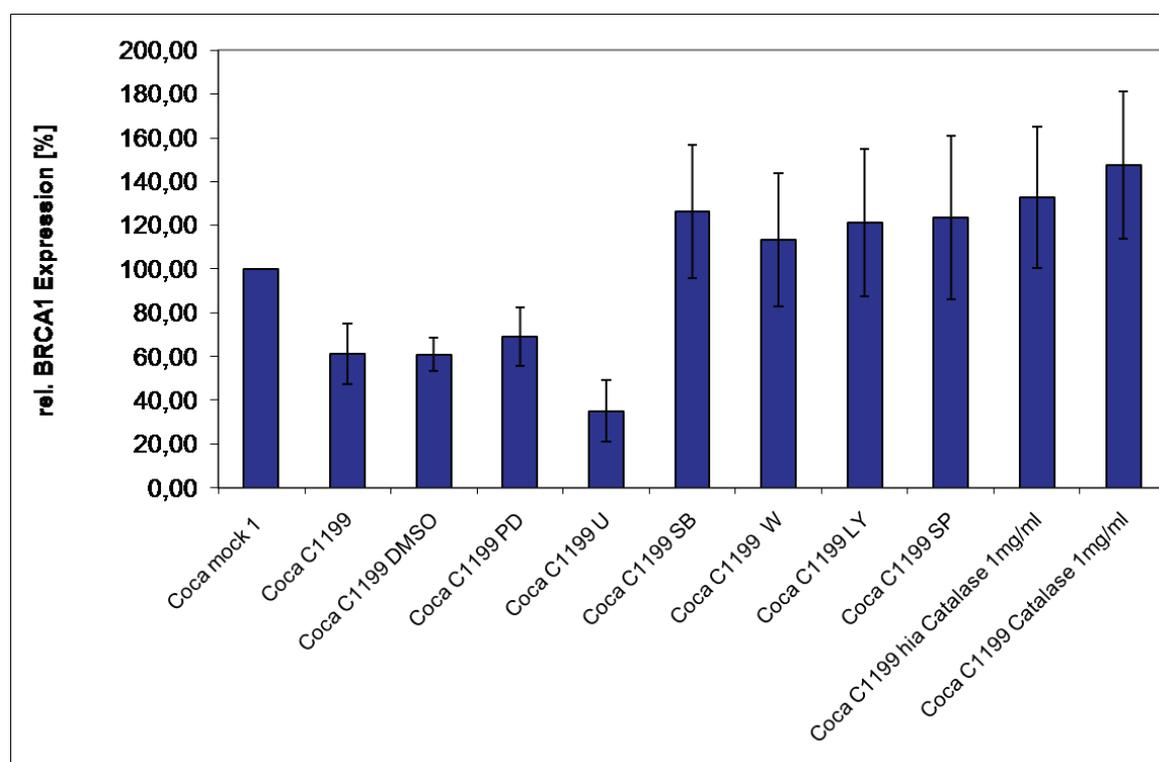


Abbildung 4.6.4: Effekte verschiedener Inhibitoren auf die BRCA1-Expression in C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B-Zellen. C1199-Tiam1-transfizierte DusCol-1B-Zellen wurden für 24 Stunden mit folgenden Inhibitoren behandelt: PD98059 (PD) 25µM, U0126 (U) 10µM, SB203580 (SB) 10µM, Catalase (1mg/ml), SP600125 (SP) 10µM, LY294002 (LY) 10µM und Wortmannin (W) 20nM. Als Kontrolle dienten die unbehandelten mock- und C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B-Zellen, sowie das Lösungsmittel für die Inhibitoren (DMSO) und die hitzeinaktivierte Catalase (hia Catalase). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Untersuchungen.

Bei der Untersuchung in DusCol-1B-Zellen zeigte sich, dass C1199-Tiam1 im Vergleich zu der mit dem leeren pLZRS Vektor transfizierten Kontrolle zu einer ca. 40%igen Herabregulation von BRCA1 auf RNA-Ebene führt (Abbildung 4.6.4). Dieser Effekt konnte durch die beiden ERK-Inhibitoren PD98059 und U0126 nicht antagonisiert werden. Im Gegensatz dazu waren jedoch die spezifischen Inhibitoren des p38-, PI3K und JNK-Signalweges in der Lage, die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA1 zu revertieren, zum Teil sogar über das Anfangsniveau der mock-transfizierten Kontrolle hinaus (Abbildung 4.6.4). Über die Bedeutung des ROS-Signalweges für die C1199-Tiam1-vermittelte Herabregulation von BRCA1 kann keine Aussage getroffen werden, da nicht nur die Catalase sondern auch die als Negativ-Kontrolle eingesetzte hitzeinaktivierte Catalase in mehreren Versuchsansätzen mit Hitzeinaktivierungen bis zu 30 Minuten zu einer Antagonisierung des Tiam1-Effektes führten.

Die Untersuchung in BPH-1-Zellen ergab ähnliche Ergebnisse wie die Untersuchung in DusCol-1B-Zellen (Abbildung 4.6.5). Auch hier führte C1199-Tiam1 zu einer ca. 40%igen Verminderung der BRCA1-Expression. Außerdem hatten auch in diesem Zellsystem die ERK-Inhibitoren PD98059 und U0126 keinen Einfluss auf die BRCA1-Expression, während die selektiven Inhibitoren des p38- (SB203580), PI3K- (LY294002 und Wortmannin) und JNK-Signalweges (SP600125) die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA1 vollständig antagonisierten (siehe Abbildung 4.6.5). Auch in diesen Untersuchungen konnte keine abschließende Aussage über den Einfluss der Catalase getroffen werden, da auch hier die hitzeinaktivierte Catalase als Negativ-Kontrolle den C1199-Tiam1-Effekt revertierte (siehe Abbildung 4.6.5).

Zusammenfassend kann man also schlussfolgern, dass sowohl der JNK-Signalweg als auch der p38- und PI3K-Signalweg in die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA1 involviert sind. Die Tatsache, dass in DusCol-1B- und BPH-1-Zellen jeweils ganz ähnliche Ergebnisse erzielt wurden, lässt auf einen übergeordneten Mechanismus schließen, der in verschiedenen Zellsystemen Gültigkeit zu besitzen scheint.

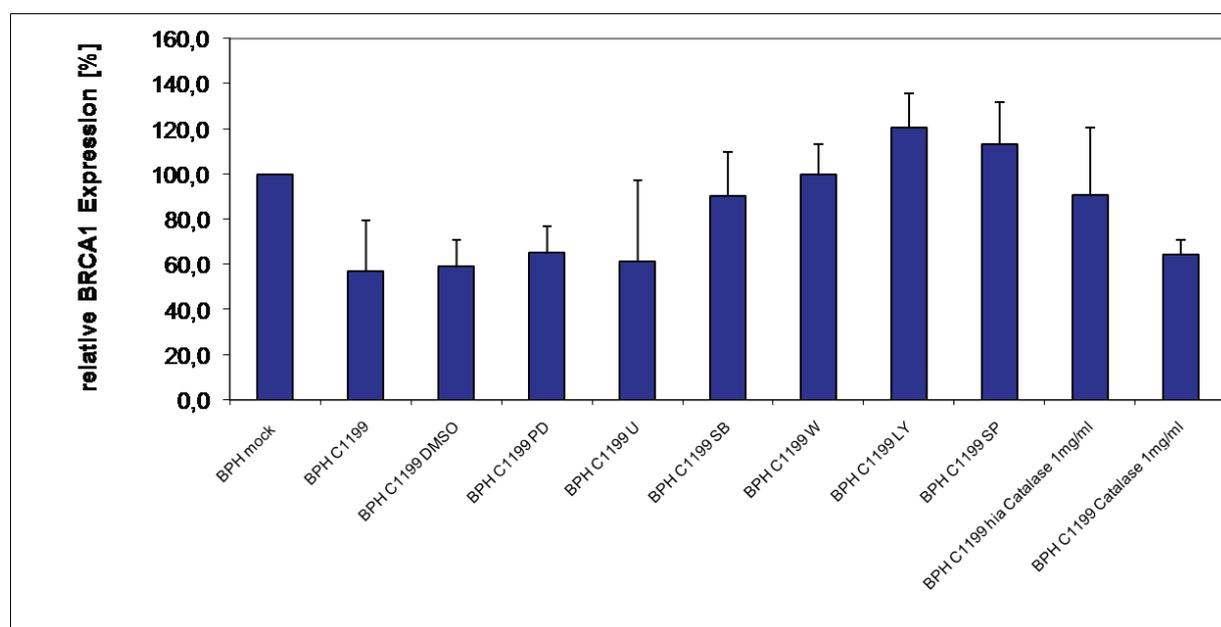


Abbildung 4.6.5: Effekte verschiedener Inhibitoren auf die BRCA1-Expression in C1199-Tiam1-transfizierten BPH-1-Zellen. Hier wurden C1199-Tiam1-transfizierte DusCol-1B-Zellen mit verschiedenen Inhibitoren für 24 Stunden inkubiert. Folgende Inhibitoren wurden eingesetzt: PD98059 (PD) 25 μ M, U0126 (U) 10 μ M, SB203580 (SB) 10 μ M, Catalase (1mg/ml), SP600125 (SP) 10 μ M, LY294002 (LY) 10 μ M und Wortmannin (W) 20nM. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen.

Um zu überprüfen, ob auch die beobachtete inverse Beziehung zwischen der Tiam1- und BRCA2-Expression *in vivo* ein Korrelat findet, wurde in Analogie zu den Untersuchungen zu BRCA2 die BRCA1-Expression in 6 verschiedenen Prostatakarzinomen und den jeweils korrespondierenden Normalgeweben untersucht. Die Ergebnisse von zwei Tumorproben und den korrespondierenden Normalgeweben waren in diesem Versuch nicht auswertbar, daher sind nur die Ergebnisse von 4 Probenpaaren dargestellt. Im Gegensatz zu BRCA2 war für BRCA1 keine eindeutige Expressionsveränderung im Prostatakarzinom gegenüber dem Normalgewebe nachzuweisen. So fand sich lediglich in einer der 4 auswertbaren Tumorproben eine niedrigere BRCA1-Expression als im entsprechenden Normalgewebe, während in den 3 übrigen Tumorproben keine nennenswerten Effekte zu beobachten waren.

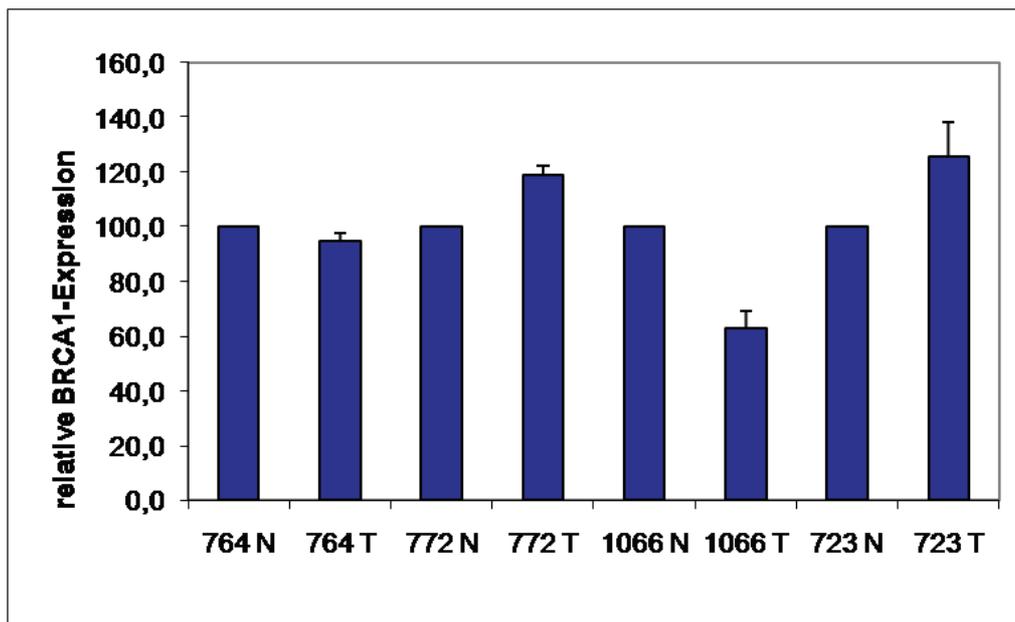


Abbildung 4.6.6: Untersuchung der BRCA1-Expression in verschiedenen Prostatakarzinomen und den jeweils korrespondierenden Normalgeweben. Die BRCA1-Expression wurde normalisiert gegen die GAPDH-Expression. Die Untersuchung erfolgte in einer Doppelbestimmung, abgebildet sind der Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung einer Doppelbestimmung. N = Normalgewebe, T = Tumorgewebe

4.7 Welche funktionelle Relevanz hat die Tiam1-BRCA2 Signaltransduktion für die DNA-Doppelstrangbruchreparatur?

Aufgrund der Ergebnisse, dass C1199-Tiam1 zur Herabregulation gleich zweier in die DNA-Reparatur involvierten Proteine führt, liegt die Vermutung nahe, dass Tiam1-transfizierte Zellen möglicherweise eine größere genomische Instabilität aufweisen, da DNA-Schäden schlechter repariert werden können. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden in den transfizierten DusCol-1B Zellen phosphoryliertes H2AX mittels Western Blot untersucht. H2AX ist eine Variante des Histons H2A, als Antwort auf DNA-Brüche wird es an einem Serin-Rest phosphoryliert (176,177). Die Menge an phosphorylierten H2AX gibt also Aufschluss darüber, wie viele DNA-Brüche in den Zellen vorliegen. Bei der Untersuchung von phosphoryliertem H2AX in den verschiedenen transfizierten DusCol-1B Zellen zeigte sich, dass C1199-Tiam1 in DusCol-1B Zellen zu einer Anreicherung an phosphoryliertem H2AX führt im Vergleich zum leeren pLZRS Vektor (siehe Abbildung 4.7.1). Die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen hat keinen Einfluss auf die verstärkte Menge an phosphoryliertem H2AX (vgl. Abbildung 4.7.1).

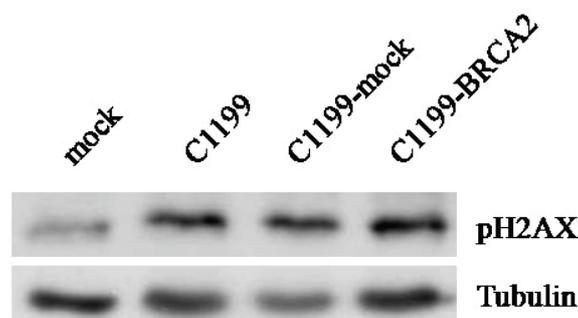


Abbildung 4.7.1: Expressionsuntersuchung von phosphoryliertem H2AX in verschiedenen transfizierten DusCol-1B Zellen. Der Nachweis erfolgte im Western Blot, als Ladekontrolle diente Tubulin. Das Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Untersuchungen.

Da die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen nicht ausreichend war, um die gesteigerte pH2AX Expression in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen zu revertieren, stellte sich die Fragen nach der Ursache hierfür. Eine mögliche

Erklärung könnte sein, dass C1199-Tiam1 nicht nur die Expression von BRCA2 vermindert, sondern zusätzlich auch Einfluss auf die Expression eines Bindungspartners von BRCA2 ausübt, welcher auch an der Doppelstrangbruchreparatur beteiligt ist. Daher wurde im nächsten Schritt die Expression von Rad51 untersucht, welcher zusammen mit BRCA2 in den Prozess der Doppelstrangbruchreparatur involviert ist (114-116). Die Untersuchung der Rad51 Expression im Western Blot zeigte, dass C1199-Tiam1 keinen Einfluss auf die Rad51-Expression hat (Abbildung 4.7.2).

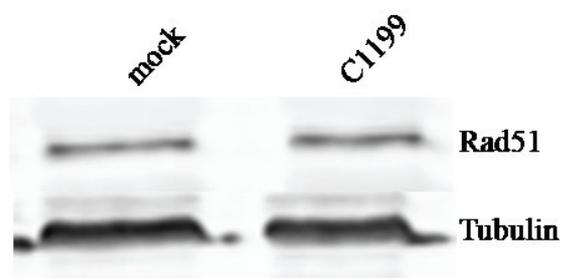


Abbildung 4.7.2: Untersuchung der Rad51-Expression in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B-Zellen. Der Nachweis erfolgte im Western Blot, als Ladekontrolle diente Tubulin. Das abgebildete Ergebnis ist repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Untersuchungen.

5. Diskussion

Der Tiam1-Rac-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Zelladhäsion, Migration, Invasion und Metastasierung. Über die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ist bislang nur wenig bekannt. Um diese weiter aufzuschlüsseln, wurde im Vorfeld dieser Arbeit nach Targetgenen von Tiam1 gesucht, die in die Vermittlung der oben erwähnten zellbiologischen Funktionen involviert sind. Dabei konnte gezeigt werden, dass BRCA2 in humanen Kolonkarzinomzellen ein Targetgen von Tiam1 ist, dessen Expression durch Tiam1 deutlich vermindert wird (Müller et al, unveröffentlichte Ergebnisse). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die funktionelle Relevanz sowie der zugrunde liegende Signalmechanismus geklärt werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob ein ähnlicher Zusammenhang auch zwischen Tiam1 und BRCA1 existiert.

BRCA2-Expression in verschiedenen transfizierten humanen epithelialen Zellen

Die Expressionsuntersuchung von BRCA2 in verschiedenen mock- und C1199-Tiam1-transfizierten humanen epithelialen Zellen zeigte, dass BRCA2 in allen diesen Zellsystemen durch C1199-Tiam1 herab reguliert wird. Umgekehrt konnte in humanen Kolonkarzinomzellen gezeigt werden, dass die Herabregulation von Tiam1 zu einer gesteigerten Expression von BRCA2 führt. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei um einen spezifischen Effekt handelt. Die Expression von BRCA2 ist bekanntermaßen abhängig vom Zellzyklus und von der Zelldichte (57,134). Um auszuschließen, dass BRCA2-Expressionsunterschiede in der vorliegenden Arbeit durch solche Variationen nur vorgetäuscht werden, wurden die zu vergleichenden Zellen wie bei Wang et al beschrieben durch Serumdepletion synchronisiert (57). Zusätzlich wurden die zu vergleichenden Zellen so ausgesät, dass die Zelldichte nach der Synchronisation ca. 50% bis 60% betrug.

Die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 konnte in verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen werden, was darauf hin deutet, dass es sich bei diesem Effekt nicht um einen zelllinienspezifischen Effekt handelt, sondern vielmehr um einen übergeordneten molekularen Mechanismus, der zumindest in mehreren epithelialen Zellsystemen Gültigkeit besitzt. Mittels Light Cycler konnte am Beispiel humaner Kolonkarzinomzellen und benignen

Prostataepithelzellen gezeigt werden, dass C1199-Tiam1 zu einer Verminderung der BRCA2-Expression auf mRNA-Ebene um ca. 40% führt, so dass die Tiam1-induzierte Herabregulation zunächst teilweise auf transkriptioneller Ebene erfolgt. Dieser scheinbar so geringe Effekt auf transkriptioneller Ebene ist aber dennoch funktionell relevant und ausreichend, da verschiedene C1199-Tiam1 induzierte Effekte durch Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen vollständig antagonisiert werden konnten.

Funktionelle Relevanz der Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA2

Da die ersten durchgeführten Untersuchungen eine funktionelle Relevanz der Tiam1-vermittelten Herabregulation von BRCA2 vermuten ließen, sollten diese Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit weiter vertieft werden. Für die funktionellen Untersuchungen standen verschieden transfizierte DusCol-1B-Zellen, die entweder mit leerem pLZRS Vektor (mock), C1199-Tiam1 (C1199), C1199-Tiam1 und leerer pCL1 Vektor (C1199-mock) oder C1199-Tiam1 und BRCA2 (C1199-BRCA2-Pool) transfiziert waren, zur Verfügung. Diese Zelllinien wurden im Rahmen der Vorarbeiten bereits etabliert.

Es ist bekannt, dass Tiam1 in der Lage ist, die Proliferation von Kolonkarzinomzellen zu stimulieren (135). Gleichzeitig konnte für BRCA2 gezeigt werden, dass es in den Prozess der Proliferationshemmung involviert ist (59,60). Daher wäre denkbar, dass die Tiam1 induzierte Proliferationssteigerung durch die Herabregulation von BRCA2 vermittelt wird. In der vorliegenden Arbeit konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. BRCA2 und C1199-Tiam1 ko-transfizierte Zellen zeigten nahezu dasselbe Proliferationsverhalten wie C1199-Tiam1-transfizierte Zellen. Die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen hatte keinen Einfluss auf die C1199-Tiam1 induzierte Proliferationssteigerung.

Für C1199-Tiam1 wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass es in humanen Kolonkarzinomzellen und anderen Zellsystemen zu einer gesteigerten Zell-Zell- und Zell-Substratadhäsion führt (11,137,171,189). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine gesteigerte Zell-Substratadhäsion nach C1199-Tiam1-Transfektion an bzw. auf Laminin bestätigt werden. Die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen führte zu einer signifikanten ($p = 0,002$) Abnahme der Adhäsion im Vergleich zu C1199-Tiam1 transfizierten Zellen. Ähnliche Ergebnisse konnten bei Adhäsionsuntersuchungen auf

unbeschichteten Zellkulturschalen, die im Vorfeld durchgeführt wurden, beobachtet werden (Müller et al, unveröffentlichte Ergebnisse). Daher kann man davon ausgehen, dass der adhäsionssteigernde Effekt von Tiam1 offenbar durch die Herabregulation von BRCA2 vermittelt wird.

Weiterhin konnte in der Vergangenheit für C1199-Tiam1 eine Hemmung der Zellmigration und Matrigelinvasion durch unsere und andere Arbeitsgruppen beobachtet werden (11). Für BRCA2 ist in dieser Hinsicht wenig bekannt. Lediglich in der Studie von Moro et al konnte ein negativer Effekt von BRCA2 auf die Tumorinvasion und Migration beobachtet werden (61). Aufgrund dieser Arbeit könnte man erwarten, dass die Herabregulation von BRCA2 durch C1199-Tiam1 nicht für die migrations- und invasionshemmenden Effekte von C1199-Tiam1 verantwortlich ist. Im Gegensatz hierzu führte jedoch die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen zu einer signifikanten Revertierung der Tiam1 induzierten Migrations- und Matrigelinvasionshemmung. Dies bedeutet, dass die Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 offenbar entscheidend für die Vermittlung der invasions- und migrationshemmenden Effekte von Tiam1 ist. Obwohl in beiden Arbeiten gleiche Methoden für die Untersuchung der Migration und Invasion verwendet wurden, lässt sich dieses unerwartete Ergebnis hinterher dadurch erklären, dass bei der Studie von Moro et al ein anderes Zellsystem (Prostata) verwendet wurde als in der vorliegenden Arbeit (Kolonkarzinomzellen) (61). Denn auch für Tiam1 konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die induzierten Effekte, in Abhängigkeit vom Zelltyp und von den Versuchs- und Zellkulturbedingungen variieren können (1,7,90). Dies zeigen auch die Ergebnisse der Untersuchungen auf bzw. im 3D-Kollagengel. Während bei C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen die Invasion im Matrigelinvasionssassay gehemmt war, konnte im 3D-Kollagengel eine Steigerung der Invasion durch C1199-Tiam1 beobachtet werden. Interessanterweise führte aber auch unter diesen Bedingungen die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen zu einer Antagonisierung der C1199-Tiam1 induzierten Invasionssteigerung. Dies deutet darauf hin, dass die Herabregulation von BRCA2 die Tiam1-induzierten Effekte auf die Tumorinvasion vermittelt, und zwar unabhängig davon, ob sie hemmend oder stimulierend sind. Dies bedeutet aber auch, dass die Entscheidung, ob Tiam1 hemmend oder stimulierend auf die Invasion wirkt, auf anderer Ebene getroffen wird.

Aufgrund der völlig entgegengesetzten Effekte von C1199-Tiam1 in den verschiedenen Invasionsuntersuchungen, stellte sich die Frage, wie dies erklärt werden könnte. Die C1199-Tiam1-induzierte Invasionshemmung im Matrigelassay konnte dadurch erklärt werden, dass die

Überexpression von C1199-Tiam1 das Gleichgewicht zwischen invasionsfördernden MMPs und invasionshemmenden TIMPs durch selektive Hochregulation von TIMP-1 und TIMP-2 zugunsten der TIMPS verschiebt und so die Invasion im Matrigelassay hemmt (11,12). Die Expression bzw. Sekretion von MMP-2 und MMP-9 wurde jedoch nicht beeinflusst (11). In den Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen zu einer Antagonisierung der C1199-Tiam1-induzierten Hochregulation von TIMP-1 und TIMP-2 führt und gleichzeitig keinen Einfluss auf die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 hat (Müller et al, unveröffentlichte Ergebnisse). Um zu überprüfen, ob diese Effekte auch abhängig von der extrazellulären Matrix sind, wurde im nächsten Schritt die MMP- und die TIMP-Sekretion auf Kollagen I untersucht. Die Überexpression von C1199-Tiam1 in DusCol-1B Zellen führte auf Kollagen I zu einer gesteigerten Sekretion von MMP-9 und proMMP-2. Gleichzeitig wurde in diesen Zellen auf Kollagen I die Sekretion von TIMP-1 stark und von TIMP-2 geringgradig reduziert. Die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen führte auf Kollagen I zu einer Revertierung der C1199-Tiam1-induzierten Effekte. Auf Kollagen I wird demnach in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen das Gleichgewicht zugunsten der invasionsfördernden MMPs verschoben, was die gesteigerte Invasion dieser Zellen im 3D-Kollagengel erklärt. Dies bestätigen auch die weiterführenden Untersuchungen im 3D-Kollagengel mit C1199-Tiam1 transfizierten Zellen, in welchen die C1199-Tiam1 induzierte Proliferationssteigerung durch Einsatz eines MMP-Inhibitors inhibiert wurde. Durch Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen wird das Ungleichgewicht wieder aufgehoben, so dass auch keine gesteigerte Invasion dieser Zellen im 3D-Kollagengel beobachtet werden konnte. Dies deutet sehr stark darauf hin, dass die Herabregulation von BRCA2 maßgeblich in die C1199-Tiam1 vermittelte Regulation der Sekretion der TIMP-Proteine und damit auch in die Regulation der Invasion involviert ist. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass Tiam1 die TIMP-Sekretion nicht nur wie aus der Literatur bekannt hoch sondern auch herab regulieren kann (11).

Die Versuche zur Invasion im 3D-Kollagengel wurden auf bzw. in Kollagen I durchgeführt, während die Versuche zur Invasion im Matrigel vor allem auf Laminin durchgeführt wurden. Matrigel besteht neben Laminin als Hauptkomponente auch aus Kollagen IV. Sander et al konnten zeigen, dass C1199-Tiam1 in Abhängigkeit vom Substrat unterschiedliche Effekte in den Zellen induzieren kann (9). Dabei induzierte Tiam1 in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Effekte auf Laminin, Kollagen I und Kollagen IV (9).

Diese uns die gegensätzlichen Ergebnisse zum Invasionsverhalten von Tiam1 zeigen gleichzeitig, dass die C1199-Tiam1 induzierte Hochregulation der TIMP-Proteine und somit auch die Invasion offenbar von den Komponenten der extrazellulären Matrix abhängig sind. Da die Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix hauptsächlich Integrinrezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt wird (78), wäre es denkbar, dass Integrine eine entscheidende Rolle in diesem Prozess einnehmen. Integrine sind sehr Liganden-spezifisch, wobei die Spezifität durch die Zusammensetzung mit der Untereinheit bestimmt wird (159). So könnte man sich vorstellen, dass je nachdem, welche Komponente der Extrazellulären Matrix (z.B. Kollagen I), als Ligand dient, unterschiedliche Integrinrezeptoren und integrinabhängige Signalwege aktiviert werden, wodurch unterschiedliche Effekte in den Zellen induziert werden. Unterstützt wird diese Vermutung durch eine Untersuchung, in der eine Tiam1-Lokalisation an der Membran beschrieben ist (15). Diese Membranassoziation ist wichtig für verschiedene Rac-abhängige Effekte (15). Durch diese nachgewiesene Membranlokalisation, wäre Tiam1 auch in räumlicher Nähe zu den Integrinen, was eine direkte Regulation noch wahrscheinlicher macht. Darüber hinaus wurde für Integrin $\alpha\beta3$ gezeigt, dass es die Transkription von TIMP-1 beeinflussen kann (158). Möglicherweise wird ja sogar diese TIMP-Regulation über Tiam1 vermittelt. Die genaue Rolle der Integrine in diesem Zusammenhang wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, bietet aber Ansatzpunkte für vertiefende Untersuchungen.

Offenbar spielt die Matrix an der die Zellen haften (vor allem die Beschichtung der Zellkulturflaschen) eine entscheidende Rolle und kann von außen die intrazellulären Vorgänge / Signalwege beeinflussen. Auch die Untersuchungen zur Zellmorphologie unterstreichen die Relevanz der Matrix. In diesen Untersuchungen induzierte C1199-Tiam1 einen deutlich spindeligeren Phänotyp der DusCol-1B-Zellen auf Laminin und Kollagen I im Vergleich zu C1199-Tiam1-transfizierten Zellen, die auf unbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert wurden. Außerdem induzierte C199-Tiam1 in DusCol-1B Zellen einen „switch“ vom dissoziierten Wachstumsmuster, wie es bei den mock-transfizierten Zellen beobachtet werden konnte, zum Wachstum in geschlossenen Zellverbänden. Bereits Junker et al konnte beobachten, dass die untersuchten Zellen einen anderen Phänotyp und andere zellbiologische Eigenschaften aufweisen, wenn sie auf unterschiedlichen Komponenten der EZM kultiviert werden (160). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte auch für C199-Tiam1 eine Veränderung des Phänotyps bei Wachstum auf Laminin und Kollagen I beobachtet werden (9). Die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen hatte keinen Einfluss

auf den Phänotyp der Zellen, wenn diese auf unbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert wurden. Auf Kollagen I führte die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen zur Ausbildung eines epitheloiden Phänotyps, ähnlich dem Phänotyp der C1199-Tiam1 transfizierten Zellen, die auf unbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert wurden. Auf Laminin wiederum führte die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen zur Ausbildung von dreidimensionalen Tumorzellsphäroiden, bei denen die Zellen wenig Kontakt mit der Laminin-beschichteten Oberfläche ausbildeten. Auch wenn diese Ergebnisse belegen, dass die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen offenbar den Phänotyp der Zellen beeinflusst hatte, so scheint die Herabregulation von BRCA2 keinen Einfluss auf die C1199-Tiam1 induzierte Änderung des Phänotyps zu haben. Denn der Effekt, der durch die Reexpression von BRCA2 in diesen Zellen induziert wurde, entspricht nicht der Leervektor transfizierten Kontrolle und somit nicht der Antagonisierung des C1199-Tiam1-Effekts.

Der in Übereinstimmung mit der Literatur beobachtete „switch“ zum Wachstum in geschlossenen Zellverbänden (11), der bei C1199-Tiam1 transfizierten Zellen in der Untersuchung der Zellmorphologie beobachtet wurde, deutet auf eine stärkere Ausbildung von Zell-Zellkontakten hin. Für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten sind verschiedene junctionale Komplexe wie tight junctions, adherens junctions und Desmosomen verantwortlich. Adherens junctions bestehen hauptsächlich aus Cadherinen, deren extrazelluläre Domänen in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Kalzium interagieren. Der zytoplasmatische Teil von E-Cadherinen bindet an Catenine, die so die Cadherine mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbinden (174). Malliri et al konnten zeigen, dass Tiam1 essentiell für die Ausbildung und Aufrechterhaltung von E-Cadherin-vermittelten Zell-Zellkontakten ist (175). Es ist bekannt, dass darauf auch der oben beschriebene „switch“ vom dissoziierten Wachstum zum Wachstum in geschlossenen Zellverbänden in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen zurückzuführen ist (11). Daher sollte die Relevanz der Herabregulation von BRCA2 für die Tiam1-induzierte Ausbindung von E-Cadherin vermittelten Zell-Zellkontakten genauer untersucht werden. Hierbei erwies sich der E-Cadherin-Antikörper jedoch als ungeeignet, so dass Untersuchungen nur mit dem Bindungspartner β -Catenin durchgeführt werden konnten. Die Untersuchungen ergaben, dass C1199-Tiam1 zu einer intrazellulären Verschiebung von β -Catenin aus dem Zytoplasma an die Zellmembran führt, ähnlich, wie es für den Bindungspartner E-Cadherin beschrieben wurde (7). Die Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen hatte jedoch keinen Einfluss auf die C1199-Tiam1 induzierte intrazelluläre Verschiebung von β -Catenin. Somit kann man davon ausgehen,

dass die Herabregulation von BRCA2 auch keine Relevanz für die Tiam1 abhängige Ausbildung von E-Cadherin vermittelten Zell-Zellkontakten hat. Hierzu passen auch die Untersuchungen am Phasenkontrastmikroskop, die belegen, dass C1199-Tiam1 und BRCA2 kotransfizierte DusCol-1B Zellen in geschlossenen soliden Zellverbänden wachsen, ähnlich wie C1199-Tiam1 transfizierte DusCol-1B Zellen. Darüber hinaus zeigen die Aufnahmen der Phasenkontrastmikroskopie, dass die Reexpression von BRCA2 keine Auswirkung auf das C1199-Tiam1 induzierte membrane ruffling hatte. Membrane ruffling wird durch eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts verursacht, was zur Anhäufung von polymerisierten Aktinruffels an der Plasmamembran führt (5). Daher kann man davon ausgehen, dass die Herabregulation von BRCA2 nicht in die Vermittlung der C1199-Tiam1-induzierten Umorganisation des Aktinzytoskeletts involviert ist.

Schon früher wurden Tiam1 und Rac in Zusammenhang mit der onkogenen Transformation von Zellen in Verbindung gebracht (14). Auch Servitja et al konnte zeigen, dass Tiam1 in die src-induzierte Transformation involviert ist (156). Liu et al wiederum konnte zeigen, dass ein knockdown von Tiam1 in Kolonkarzinomzellen zu einer Hemmung der Transformation im colony formation assay führte (157).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Transformationsassays durchgeführt. Da es sich bei den untersuchten Zellen aber um maligne Zellen handelt, kann man nicht auf transformierende Effekte der Zellen schließen, sondern vielmehr auf die Aggressivität der Zellen. C1199-Tiam1 induzierte im Soft-Agar-Assay die Ausbildung von Kolonien, dieser Effekt wurde nicht durch die Reexpression von BRCA2 revertiert. Im colony formation Assay zeigten C1199-Tiam1-transfizierte Zellen keinen Proliferationsstopp nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz. Auch dieser C1199-Tiam1-induzierte Effekt wurde durch die Reexpression von BRCA2 nicht antagonisiert. Die von C1199-Tiam1-induzierte „Aggressivität“ wird demnach nicht durch die Herabregulation von BRCA2 vermittelt. In keiner dieser Untersuchungen konnte eine Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen eine Antagonisierung der C1199-Tiam1 induzierten Effekte bewirken.

Zusammenfassend betrachtet ist die Herabregulation von BRCA2 für viele aber nicht alle metastasierungs- bzw. invasionsrelevanten zellbiologischen Funktionen von Tiam1 von entscheidender Bedeutung. Dass diese Effekte tatsächlich auf die Herabregulation von BRCA2 zurück zu führen sind, zeigt die Antagonisierung dieser Effekte nach Reexpression von BRCA2,

während gleichzeitig die entsprechenden Kontrolle keinen Unterschied zu C1199-Tiam1 transfizierten Zellen zeigte. Außerdem belegt das Ergebnis der Proliferationsuntersuchung, dass Unterschiede in den funktionellen Analysen zwischen C1199-mock und C1199-BRCA2-Pool transfizierten DusCol-1B Zellen nicht durch Proliferationsunterschiede verursacht wurden, da bei diesen Zellen ein annähernd gleiches Proliferationsverhalten beobachtet werden konnte. Daher kann man davon ausgehen, dass die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen spezifisch sind und tatsächlich auf die Herabregulation von BRCA2 zurück geführt werden können.

Molekulare Grundlagen der Herabregulation von BRCA2

Wie oben erwähnt wird, kann Tiam1 die Aktivität von E-Cadherin beeinflussen, gleichzeitig hängen die Effekte von Tiam1 entscheidend davon ab, ob die Etablierung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zellkontakte unter den jeweiligen Versuchsbedingungen möglich ist oder nicht (7,9). Die Herabregulation von BRCA2 durch C1199-Tiam1 scheint für die Ausbildung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zellkontakte nicht relevant zu sein. Andererseits wäre aber auch denkbar, dass genau dieser Mechanismus und die dadurch aktivierten Signalwege die Herabregulation von BRCA2 vermitteln. Dies kann jedoch auch ausgeschlossen werden, da BRCA2 auch dann durch C1199-Tiam1 herab reguliert wurde, wenn die Etablierung von E-Cadherin vermittelten Zell-Zellkontakten durch Kalziumentzug verhindert wurde.

Aus der Literatur ist bekannt, dass BRCA2 über Skp2, Parp-1 oder Slug herab reguliert werden kann. So wird die Degradation von BRCA2 bei Moro et al durch die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs vermittelt, an dessen Ende Skp2 steht (92). Wang et al beschreibt eine Herabregulation von BRCA2, die durch eine Bindung von Parp-1 an eine silencer-region des BRCA2-Promoters induziert wird (136). Tripathi et al konnte eine Regulation der BRCA2-Expression durch Bindung des Slug-Repressor-Proteins an die E2-Box des BRCA2-Promoters nachweisen (91). Um zu überprüfen, ob auch die C1199-Tiam1-induzierte BRCA2-Herabregulation über einen dieser bekannten BRCA2-Repressoren vermittelt wird und C1199-Tiam1 die Expression einer dieser Repressoren selbst beeinflusst, wurde die Expression dieser Proteine zunächst mittels Western Blot in verschiedenen pLZRS mock- und C1199-Tiam1 transfizierten Zellen miteinander verglichen. Die Untersuchung zeigte, das C1199-Tiam1 keinen Einfluss auf die Expression der verschiedenen BRCA2-Repressoren Slug, Skp2 und Parp-1 hat.

Dieses Ergebnis allein schließt aber nicht aus, dass die Regulation der C1199-Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA2 dennoch über einen dieser Repressoren vermittelt werden könnte, da deren Wirkung nicht nur vom Expressionslevel des Proteins, sondern auch von dessen intrazellulärer Lokalisation entscheidend abhängt (139). So ist z.B. für Slug und für Skp2 bekannt, dass sie sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert sein können und zwischen diesen Kompartimenten ein „Shutteln“ statt finden kann (140-143). Um zu überprüfen, ob Tiam1 die intrazelluläre Lokalisation von Skp2 und Slug beeinflusst, wurde die intrazelluläre Lokalisation beider Proteine in mock- und C1199-Tiam1-transfizierten DusCol-1B und BPH-1 Zellen mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Die Untersuchung zeigte, dass Slug und Skp2 in allen untersuchten Zelllinien im Kern lokalisiert sind und Tiam1 keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation dieser Proteine hatte. Dieses Ergebnis schließt allerdings immer noch nicht ganz eine Beteiligung einer dieser Regulatoren in der Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA2 aus. Vorstellbar wäre z.B. auch eine mögliche Aktivierung durch Phosphorylierung einer dieser Proteine durch einen Tiam1-induzierten Signalweg wodurch dann die Herabregulation von BRCA2 eingeleitet wird. Denkbar wäre darüber hinaus auch, dass es noch andere zurzeit vielleicht noch unbekannte BRCA2 Repressoren gibt, die durch Tiam1 aktiviert werden, oder dass Tiam1 einen Aktivator der BRCA2 Expression hemmt.

Da Tiam1 Rac aktiviert, könnte die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 durch einen Signalweg „downstream“ von Rac vermittelt werden, denn für Rac konnte gezeigt werden, dass es eine Reihe verschiedener Signalwege induzieren kann (12,46-51). JNK, p38, ROS, ERK und PI3K können bekanntermaßen die Transkription anderer Gene beeinflussen. Moro et al konnte zeigen, dass die Aktivierung von ERK zu einer Hochregulation von BRCA2 und die Aktivierung von PI3K/Akt zu einer Herabregulation von BRCA2 führt (154,155). So wäre denkbar, dass die Rac-abhängige Aktivierung der PI3K die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 vermitteln könnte. Daher wurden die Rac-abhängigen Signalwege selektiv in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen blockiert und anschließend die BRCA2-Expression untersucht. Die Untersuchung zeigte in Übereinstimmung mit der Untersuchung von Moro et al (155), dass PI3K zumindest in den Kolonkarzinomzellen in die C1199-Tiam1-abhängige Herabregulation von BRCA2 involviert zu sein scheint. So konnte die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 antagonisiert werden, wenn der PI3K/Akt-Signalweg durch LY294002 und Wortmannin blockiert wurde. Darüber hinaus konnte die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 in DusCol-1B Zellen auch antagonisiert

werden, wenn die JNK- und p38- Signalwege selektiv blockiert wurden. Die selektive Blockierung des ERK-Signalwegs hatte keinen Einfluss auf die C1199-Tiam1 abhängige Herabregulation von BRCA2. Die Rac abhängige Aktivierung von ERK scheint demnach nicht in die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 in DusCol-1B Zellen involviert zu sein.

Die Untersuchung in BPH-1 Zellen zeigte, dass C1199-Tiam1 nicht in der Lage ist die Expression von BRCA2 zu hemmen, wenn selektiv der JNK-Signalweg oder der ROS-Signalweg gehemmt werden. In beiden Zellsystemen gibt es demnach eine Übereinstimmung, so scheint JNK maßgeblich in diesen Prozess involviert zu sein, während ERK offenbar keinen Einfluss auf die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 hat. In BPH-1 Zellen konnte jedoch im Gegensatz zu den Kolonkarzinomzellen kein Einfluss von p38 und PI3K auf die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 belegt werden. Die C1199-Tiam1-abhängige Herabregulation von BRCA2 konnte nicht durch selektive Blockierung von p38 und PI3K antagonisiert werden.

In der Vergangenheit konnte von der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die transkriptionelle Hochregulation von TIMP-1 durch die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), speziell H_2O_2 , vermittelt wird (12). Interessanterweise gibt es mehrere Studien, in denen eine vermehrte H_2O_2 -Bildung zu einer Aktivierung von JNK führt (144,145). Darüber hinaus konnte eine mögliche Bindestelle für JNK im dritten Exon von BRCA2 identifiziert werden, wobei die funktionelle Relevanz dieser Bindestelle noch unklar ist (146,147). Denkbar wäre aber, dass C1199-Tiam1 über die Aktivierung von Rac zunächst zu einer vermehrten Bildung von H_2O_2 führt. Anschließend führt die H_2O_2 -Bildung zur Aktivierung von JNK, was wiederum die Transkription von BRCA2 regulieren könnte (siehe Abbildung 5.1).

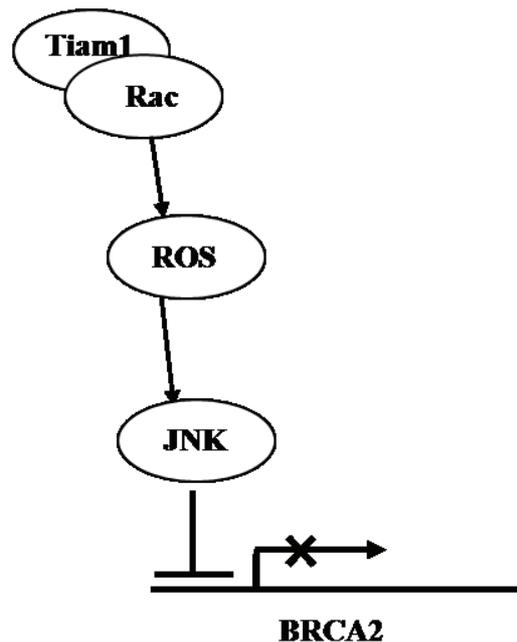


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Signalwegs, der möglicherweise in BPH-1-Zellen zur Herabregulation von BRCA2 führt. Tiam1 führt über die Aktivierung von Rac zur vermehrten Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere zur Bildung von H_2O_2 . H_2O_2 wiederum aktiviert JNK, welches die Transkription von BRCA2 hemmt.

Dass die Regulation der C1199-Tiam1-induzierten Herabregulation in DusCol-1B und BPH-1 Zellen nicht übereinstimmt, könnte damit erklärt werden, dass unterschiedliche Zellsysteme miteinander verglichen wurden. So fanden die Untersuchungen in malignen Kolonkarzinomzellen und benignen Prostatazellen statt. Außerdem wäre vorstellbar, dass p38 und PI3K nicht unbedingt für C1199-Tiam1 induzierte Herabregulation von BRCA2 benötigt werden und nur zusätzlich zu JNK durch nebengeschaltete Signalwege die BRCA2 Herabregulation beeinflussen. So ist z.B. bekannt, dass PI3K selbst BRCA2 herab regulieren kann (154,155). Außerdem konnte gezeigt werden, dass PI3K über Rac1 die Aktivität von JNK regulieren kann (173,190). Darüber hinaus kann PI3K auch p38 regulieren, welches selbst auch JNK Aktivität beeinflussen kann (173,188).

In vivo Korrelation von Tiam1 und BRCA2

Da die Expression von BRCA2 und Tiam1 in mehreren Zellsystemen *in vitro* korreliert, sollte auch die *in vivo* Situation untersucht werden. Moro et al konnte in seiner Studie zeigen, dass die BRCA2-Expression in der Mehrzahl der sporadischen Prostatakarzinome, verglichen mit dem normalen Prostatagewebe, entweder deutlich herab reguliert ist, oder sogar völlig fehlt (61). Diese Ergebnisse stimmen mit einer anderen immunhistochemischen Untersuchung am Noble-Ratten Model überein, bei der eine verminderte BRCA2-Expression in dysplastischen und neoplastischen Prostatalesionen beobachtet werden konnte (149). Interessanterweise hat unsere Arbeitsgruppe in eigenen Untersuchungen zeigen können, dass Tiam1 in 95% aller Prostatakarzinome und deren Vorläuferläsionen signifikant stärker exprimiert wird als im korrespondierenden Normalgewebe der Prostata (29). Daher wurden aus der untersuchten Prostataserie zufällig 6 Tumorproben und das korrespondierende Normalgewebe ausgewählt und die BRCA2 Expression in diesen Proben untersucht. In Übereinstimmung mit Moro et al konnte in allen der untersuchten Tumorproben jeweils eine reduzierte BRCA2-Expression im Tumorgewebe verglichen mit dem zugehörigen Normalgewebe beobachtet werden, sodass auch *in vivo* die Tiam1 und BRCA2 Expressionen negativ miteinander korreliert sind.

Einfluss von Tiam1 auf die Expression von BRCA1

BRCA1 ist wie BRCA2 ein Tumorsuppressorgen, das funktionell in die Regulation des Zellzyklus und die Reparatur von DNA-Schäden eingebunden ist (150,151). Die bisher aus der Literatur bekannten zellbiologischen Funktionen von BRCA1 lassen auf eine mögliche funktionelle Relevanz für die Tiam1-induzierten Effekte schließen. So konnte gezeigt werden, dass BRCA1 einen Einfluss auf die Proliferation hat und eine verminderte BRCA1-Expression in NIH 3T3 Zellen eine Transformation in diesen Zellen induziert (89,120,152,153). Außerdem wurde gezeigt, dass eine Überexpression von BRCA1 in Mamma- und Ovarialkarzinomen zu einer Hemmung der „colony formation“ führte (89).

Daher wurde untersucht, ob Tiam1 auch die Expression von BRCA1 beeinflusst und dies möglicherweise Tiam1-Effekte auf die Proliferation und Transformation vermittelt. Hierzu wurde die Expression von BRCA1 in verschiedenen stabil mit mock- bzw. C1199-Tiam1 transfizierten

humanen epithelialen Zellen verglichen. Dabei zeigte sich, dass C1199-Tiam1 in der Tat in allen untersuchten humanen epithelialen Zellen zu einer Hemmung der Expression von BRCA1 auf Proteinebene führt. Da diese Hemmung auch auf mRNA-Ebene nachweisbar war, handelt es sich offenbar um einen transkriptionellen Regulationsprozess, wenngleich ein Mechanismus, der die RNA-Stabilität beeinflusst, nicht ausgeschlossen werden kann. Um aus zu schließen, dass die beobachteten Effekte auf Unterschieden im Zellzyklus beruhen (63-65), wurden alle Untersuchungen erst nach Synchronisation der Zellen durchgeführt. Wie auch bei BRCA2 konnte die Korrelation der Expression von Tiam1 und BRCA1 auch umgekehrt, bei einem knock-down von Tiam1 nachgewiesen werden. So konnte eine verstärkte Expression von BRCA1 beobachtet werden, wenn gleichzeitig die Expression von Tiam1 herab reguliert war. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Herabregulation von BRCA1 durch Tiam1, um einen spezifischen Effekt handelt. Somit ist C1199-Tiam1 in der Lage, die Expression gleich zwei wichtiger Tumorsuppressorgene herab zu regulieren, was auf eine wichtige Rolle von Tiam1 für die Tumorentstehung hinweist.

Darüber hinaus wurde auch die funktionelle Relevanz der C1199-Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA1 für die verschiedenen Effekte von Tiam1 untersucht. Die Untersuchung erfolgte analog zu der vorliegenden Arbeit im Rahmen einer Diplomarbeit. Dabei konnte auch eine funktionelle Relevanz der Herabregulation von BRCA1 nachgewiesen werden (Engers et al, unveröffentlichte Ergebnisse). Hiernach scheinen BRCA1 und BRCA2 teils überlappende, teils aber auch divergierende Eigenschaften hinsichtlich der Vermittlung Tiam1-induzierter Funktionen zu besitzen. So hatte die Reexpression von BRCA1 und BRCA2 in DusCol-1B Zellen jeweils die gleichen antagonisierenden Effekte auf die Zell-Substrat-Adhäsion, Migration und Invasion von Zellen, die Effekte auf den morphologischen Phänotyp waren allerdings unterschiedlich (unveröffentlichte Ergebnisse). DusCol-1B-Zellen, die sowohl mit C1199-Tiam1 als auch mit BRCA1 kotransfiziert waren, zeigten einen eher spindelförmigen Phänotyp, ähnlich wie man ihn bei pLZRS Leervektor-transfizierten Zellen beobachten konnte. Im Gegensatz hierzu zeigten BRCA2 und C1199-Tiam1 kotransfizierten DusCol-1B Zellen einen epitheloiden Phänotyp, den man auch bei C1199-Tiam1 transfizierten Zellen beobachten konnte. Während die Reexpression von BRCA2 die Morphologie C1199-Tiam1-transfizierter Zellen nicht beeinflusst hatte, führte die Reexpression von BRCA1 in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen zu einer Revertierung des C1199-Tiam1-induzierten epitheloiden Phänotyps.

Anschließend stellte sich die Frage nach dem molekularen Mechanismus der C1199-Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA1. Analog zu den Untersuchungen der molekularen Mechanismen der Herabregulation von BRCA2 wurden für diese Untersuchung verschiedene Signalwege „downstream“ von Rac selektiv blockiert. Dabei zeigte sich, dass die C1199-Tiam1-abhängige Herabregulation von BRCA1 antagonisiert werden konnte, wenn selektiv p38, PI3K und JNK blockiert wurden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur Untersuchung des Mechanismus der C1199-Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA2 in Kolonkarzinomzellen scheinen also p38, PI3K und JNK in diesen Prozess involviert zu sein, während ERK hingegen offenbar nicht an der Herabregulation von BRCA1 beteiligt ist. Dieses Ergebnis konnte sowohl in BPH-1 als auch in DusCol-1B Zellen reproduziert werden, daher scheint es sich hierbei um einen übergeordneten Mechanismus zu handeln, der zumindest in mehreren Zellsystemen Gültigkeit hat. Der genaue Signalmechanismus muss allerdings noch weiter aufgeschlüsselt werden, denn die Ergebnisse zeigen nur, dass alle drei Proteine offenbar in die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA1 involviert sind, jedoch bleibt z.B. offen, ob sie parallel oder nacheinander geschaltet in diesem Signalweg agieren. Bisher ist aus der Literatur nichts bekannt, was auf den genauen Regulationsmechanismus der Expression von BRCA1 durch p38, PI3K und JNK schließen lässt. Es gibt verschiedene Studien die alle zeigen, dass BRCA1 eine regulatorische Funktion über p38, JNK und PI3K ausüben kann, nicht aber umgekehrt (161-165). Die beobachtete Hemmung der Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA1 durch selektive Blockierung von p38, JNK, und PI3K scheint aber spezifisch zu gewesen zu sein, denn DMSO, was als Lösungsmittel für die einzelnen Inhibitoren diente, hatte genau wie die beiden ERK-Inhibitoren keinen Effekt auf die C1199-Tiam1 induzierte Herabregulation von BRCA1. Genauso können zellzyklusspezifische Effekte ausgeschlossen werden, da die Zellen für die Behandlung mit den Inhibitoren mit festgelegter Zellzahl pro Zellkulturschale ausgesät wurden. Alle Zellen wurden gleich behandelt und zum gleichen Zeitpunkt lysiert. Dass aber zumindest in den Kolonkarzinomzellen die selben Proteine in die Tiam1-vermittelte Herabregulation der beiden Tumorsuppressorgene involviert zu sein scheinen, unterstützt die unlängst aufgestellte Vermutung, dass die Regulation der Expression von BRCA1 und BRCA2 über den selben Mechanismus verlaufen könnte (84).

Nachdem es so viele Anzeichen für Gemeinsamkeiten zwischen der Expression und Funktion von BRCA2 und BRCA1 gab, sollte auch eine BRCA1 und Tiam1 *in vivo* Korrelation untersucht werden. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die BRCA1 Expression im

Mamakarzinom deutlich reduziert ist (88,89,149). Auch die Relevanz von BRCA1 im Prostatakarzinom wurde in verschiedenen Studien debattiert. So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass BRCA1 als Koregulator des Androgenrezeptors fungiert und eine positive Rolle im Androgen-induzierten Zelltod spielt (166,167). Darüber hinaus zeigten DU145 Zellen, die mit BRCA1 transfiziert wurden, eine gehemmte Proliferation und Abweichungen in den Expressionsprofilen wichtiger Schlüsselregulatorproteine (168). Kürzlich konnte Schayek et al mittels tissue microarray zeigen, dass BRCA1 im Prostatakarzinom höher exprimiert als im normalen Prostataepithel (169). Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man vermuten, dass die *in vitro* beobachtete BRCA1-Tiam1-Korrelation der Expression *in vivo* nicht gültig ist. Daher wurde auch in einigen unserer Prostatatumorproben die Expression von BRCA1 mittels LightCycler untersucht. Dabei konnten zumindest auf RNA-Ebene keine eindeutigen Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalproben beobachtet werden. Dieses schließt aber Expressionsunterschiede auf Proteinebene nicht aus, so dass hierzu künftig noch weiterführende Untersuchungen notwendig sind.

Funktionelle Relevanz der Tiam1-BRCA2 (-BRCA1) Signaltransduktion für die DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Da sowohl BRCA1 als auch BRCA2 in die DNA-Reparatur eingebunden sind und Tiam1 die Herabregulation beider Proteine induziert, liegt die Vermutung nahe, dass Tiam1-transfizierte Zellen möglicherweise mehr DNA-Brüche akkumulieren, da diese schlechter repariert werden können. Daher stellte sich die Frage nach der funktionellen Relevanz der Herabregulation der beiden Tumorsuppressorgene für die DNA-Doppelstrangbruchreparatur in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen. Bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen sammeln sich verschiedene DNA-Damage-Reparatur-Proteine in sogenannten Foci am Ort der DNA-Läsion. Dabei werden Doppelstrangbrüche durch einen MRN-Komplex erkannt, der aus MRE11, Rad50 und NBS1 besteht (180). Dieser Komplex rekrutiert und aktiviert die ATM-Kinase, welche H2AX am Serin 139 phosphoryliert (178,180). Die Phosphorylierung von H2AX dient als Signal für die Ansammlung der verschiedenen DNA-Damage-Reparatur-Proteinen (179). Um einen Eindruck über die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen zu bekommen, wurde daher die Menge an phosphoryliertem H2AX mittels Western Blot in den verschieden transfizierten DusCol-1B Zellen untersucht.

Die Untersuchung zeigte, dass C1199-Tiam1-transfizierte Zellen mehr phosphoryliertes H2AX exprimieren, was darauf hindeutet, dass in diesen Zellen deutlich mehr DNA-Doppelstrangbrüche vorhanden waren als in der Leervektor-transfizierten Kontrolle. Das Expressionslevel von pH2AX in BRCA2 und C1199-Tiam1 kotransfizierten Zellen entsprach dem Level in C1199-Tiam1-transfizierten Zellen. Die Reexpression von BRCA2 in diesen Zellen hatte demnach keinen Einfluss auf die Menge von pH2AX. Die Herabregulation von BRCA2 scheint daher allein nicht für die gesteigerte Menge an DNA-Brüchen verantwortlich zu sein.

Dieses Ergebnis könnte damit erklärt werden, dass Tiam1 die Expression weiterer DNA-Doppelstrangbruch Reparaturproteine beeinflussen kann und so die gesteigerte pH2AX-Expression durch Reexpression von BRCA2 allein nicht revertiert werden konnte. Daher wurde im Folgenden die Expression des BRCA2 Bindungspartners Rad51 in C1199-Tiam1 transfizierten Zellen untersucht. Wie schon oben erwähnt ist Rad51 essentiell für die DNA-Doppelstrangbruchreparatur indem es den Strangaustausch einleitet (114-116). Die Untersuchung der Rad51 Expression zeigte jedoch, dass C1199-Tiam1 keinen Einfluss auf die Rad51 Expression ausübt. Eine weitere mögliche Erklärung für die unveränderte pH2AX Expression nach BRCA2 Reexpression in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen könnte daher möglicherweise die verminderte Expression von BRCA1 in diesen Zellen liefern. Denn obwohl BRCA2 in diesen Zellen erfolgreich reexprimiert wurde, ist die Menge an BRCA1 immer noch reduziert. BRCA1 gehört ebenfalls zu den DNA-Damage-Reparatur Proteinen, die als Folge der H2AX Phosphorylierung durch den MRN-Komplex an den DNA-Bruch rekrutiert werden (179,180). Bei DNA-Doppelstrangbrüchen arbeitet BRCA1 mit BRCA2, Rad51 und dem MRN-Komplex zusammen, um diese Doppelstrangbrüche mittels homologer Rekombination zu reparieren (siehe Abbildung 5.2) (83). Somit könnte die verminderte BRCA1-Expression die unveränderte pH2AX Expression nach Reexpression von BRCA2 in C1199-Tiam1 transfizierten DusCol-1B Zellen erklären.

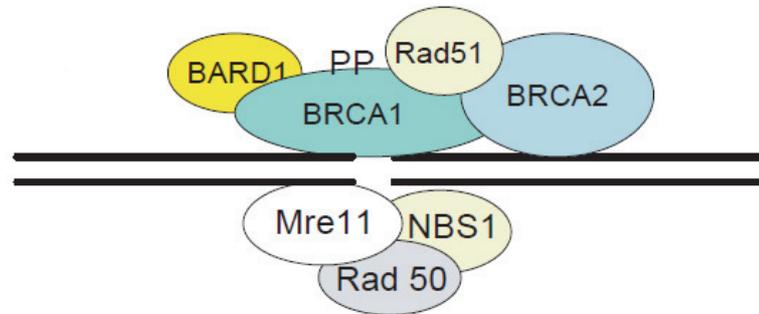


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Der MRN-Komplex, bestehend aus Mre11, Rad50 und NBS1 erkennt DNA-Doppelstrangbrüche und bewirkt die Phosphorylierung von H2AX. Das dient wiederum als Signal zur Rekrutierung verschiedener DNA-Damage-Reparatur-Proteine an den Ort der DNA-Läsion. Abbildung aus 83.

6. Zusammenfassung

Der Tiam1/Rac-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Zelladhäsion, Migration, Invasion und Metastasierung. Allerdings ist bislang nur wenig über die molekularen Mechanismen bekannt, über die diese wichtigen biologischen Funktionen vermittelt werden. Bei einer vergleichenden Expressionsanalyse von mock- und C1199-Tiam1 transfizierten Karzinomzellen mithilfe von cDNA-Microarrays, konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Tumorsuppressorgen BRCA2 ein potentielles Targetgen von Tiam1 ist, dessen Expression durch Tiam1 herab reguliert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die funktionelle Relevanz und den Regulationsmechanismus der C1199-Tiam1 abhängigen Herabregulation von BRCA2 zu untersuchen. Darüber hinaus wurde auch die BRCA1 und Tiam1 Korrelation der Expression untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zunächst das Ergebnis der cDNA-Microarray-Untersuchung in verschiedenen humanen epithelialen Zellen bestätigt werden, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich bei der C1199-Tiam1-abhängigen Herabregulation von BRCA2 um einen neuen Mechanismus handelt, der von übergeordneter Bedeutung zu sein scheint. In humanen Kolonkarzinomzellen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von Tiam1 und BRCA2 auch umgekehrt, bei einer verminderten Expression von Tiam1, korreliert. Daher kann man hier von einem spezifischen Effekt ausgehen. Ein initialer Versuch mit 6 Prostatatumorproben und korrespondierenden Normalgeweben bestätigte außerdem, dass die Herabregulation von BRCA2 auch *in vivo* relevant ist.

Mit Hilfe von funktionellen Untersuchungen mit stabil transfizierten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation von BRCA2 für die Tiam1-induzierten Effekte tatsächlich funktionell relevant ist. So scheint die Herabregulation von BRCA2 in DusCol-1B Zellen die Tiam1-induzierten Effekte auf die Zell-Substrat-Adhäsion und Zellmigration zu vermitteln. Außerdem revertierte die Reexpression von BRCA2 in DusCol-1B Zellen die Effekte von Tiam1 auf die Tumordinvasion und zwar unabhängig davon, ob diese hemmend oder stimulierend sind.

Im Gegensatz hierzu wurden allerdings die C1199-Tiam1-induzierten Effekte auf die Proliferation, die intrazelluläre Lokalisation von β -Catenin, das membrane ruffling und auf verschiedene Transformationsassays durch Reexpression von BRCA2 nicht beeinflusst. Diese

Tiam1- induzierten Effekte werden offenbar durch andere Mechanismen und nicht durch die Herabregulation von BRCA2 vermittelt.

Somit wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, dass mehrere wichtige aber nicht alle zellbiologischen Funktionen von Tiam1 ganz wesentlich durch die Herabregulation von BRCA2 vermittelt werden.

Die Untersuchung des Regulationsmechanismus ergab, dass vor allem JNK in die C1199-Tiam1 abhängige Herabregulation von BRCA2 eingebunden ist. Während in BPH-1 Zellen die C1199-Tiam1-induzierte Herabregulation von BRCA2 vermutlich aus einer vermehrten Bildung von ROS und einer Aktivierung des JNK-Signalwegs resultiert, sind in DusCol-1B Zellen neben JNK scheinbar auch p38 und PI3K in diesen Mechanismus involviert.

Die Untersuchungen ergaben weiterhin, dass Tiam1 neben der Regulation von BRCA2 auch in der Lage ist, ein weiteres Tumorsuppressorgen -BRCA1- herabzuregulieren. Auch dieser Mechanismus konnte in mehreren Zellsystemen nachgewiesen werden und scheint daher von übergeordneter Bedeutung zu sein. Die Untersuchung zum Signalmechanismus zeigte, dass in die Regulation der C1199-Tiam1-induzierten Herabregulation von BRCA1 p38, PI3K und JNK involviert sind.

Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Tiam1 die Expression von gleich zwei wichtigen Tumorsuppressorgen in verschiedenen Zellsystemen herab regulieren kann und dieser Mechanismus ganz wesentlich für die Vermittlung der verschiedenen zellbiologischen Tiam1-Effekte ist. Diese wichtige Erkenntnis unterstreicht die Bedeutung von Tiam1 für die Tumorentstehung.

7. Abstract

The Tiam1-Rac signaling plays an important role in regulation of adhesion, migration, invasion and metastasis. Despite the established role of Tiam1-Rac-signaling just a little is known about the molecular mechanisms regulating these important functions. Therefore the expression profiles of mock- and C1199-Tiam1 transfected carcinoma cells were compared in a cDNA Microarray. This analysis revealed that the tumor suppressor gene *BRCA2* is a target of Tiam1 and *BRCA2* expression is down regulated by Tiam1.

In this study the functional relevance and molecular mechanisms of Tiam1 induced downregulation of *BRCA2* were investigated. Further on a *BRCA1* and Tiam1 correlation was analyzed.

In the first part of the work the C1199-Tiam1 induced downregulation of *BRCA2* could be confirmed in different human epithelial cells. These results provide evidence that downregulation of *BRCA2* is a general mechanism, which seems to be of higher importance. Furthermore, expression analysis with *DusCol-1B* cells showed increased *BRCA2* expression after Tiam1 knock-down, showing a reverse correlation of Tiam1 and *BRCA2* expression, indicating a specific effect. Further investigations revealed a decreased *BRCA2* expression in prostate carcinomas compared to the benign secretory epithelium, indicating this mechanism is valid also *in vivo*.

Moreover, the functional analyses with *BRCA2* and C1199-Tiam1 transfected *DusCol-1B* cells revealed a functional relevance of downregulation of *BRCA2* for the Tiam1-dependend effects. The reexpression of *BRCA2* in C1199-Tiam1 transfected *DusCol-1B* cells has reverted the C1199-Tiam1 induced effects on adhesion and migration. In addition, Reexpression of *BRCA2* has inverted the Tiam1 induced effects on invasion, independent of the Tiam1-induced effects on invasion were inhibitive or stimulating.

In contrast, the C1199-Tiam1 induced effects on proliferation, localization of β -catenin, membrane ruffling and transformation assays were not affected by reexpression of *BRCA2*. These Tiam1 induced effects seem to be mediated by other mechanisms than the downregulation of *BRCA2*.

Taken together, the results hint at an important role of the downregulation of *BRCA2* for some but not all of Tiam1 affected biological functions. Above all, this work also reveals an important

role for BRCA2 in invasion and metastasis relevant signaling beside its important role in DNA-damage repair.

The analyses of the molecular mechanisms demonstrated that JNK is involved in the signaling of the C1199-Tiam1-induced downregulation of BRCA2. While the downregulation of BRCA2 in BPH-1 cells seems to be mediated by generation of reactive oxygen species and activation of JNK-pathway, in DusCol-1B cells p38 and PI3K seem to be involved in this mechanism in addition to JNK.

Investigation of BRCA1 expression in different transfected human epithelial cells demonstrated a decreased BRCA1 expression in C1199-Tiam1 transfected cells, indicating a general mechanism of higher importance. Further analyses could show that downregulation of BRCA1 seems to be mediated by activation of p38, PI3K and JNK whereas activation of E-cadherin dependent cell-cell contacts plays no important role in this context.

In conclusion, the downregulation of BRCA1 and BRCA2 is a completely new functional relevant mechanism in Tiam1-signaling. Given the well established roles of BRCA1 and BRCA2 as tumor suppressor genes, this newly identified mechanism might play a major role in Tiam1 dependent tumor development and progression.

8. Literatur

- (1) Habets GG, Scholtes EH, Zuydgeest D, van der Kammen RA, Stam JC, Berns A, et al. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell* 1994 May 20;77(4):537-49.
- (2) Michiels F, Habets GG, Stam JC, van der Kammen RA, Collard JG. A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* 1995 May 25;375(6529):338-40.
- (3) Wennerberg K, Der CJ. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 2004 Mar 15;117(Pt 8):1301-12.
- (4) Haeusler LC, Blumenstein L, Stege P, Dvorsky R, Ahmadian MR. Comparative functional analysis of the Rac GTPases. *FEBS Lett* 2003 Dec 18;555(3):556-60.
- (5) Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992 Aug 7;70(3):401-10.
- (6) Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 1995 Sep 1;269(5228):1270-2.
- (7) Hordijk PL, ten Klooster JP, van der Kammen RA, Michiels F, Oomen LC, Collard JG. Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* 1997 Nov 21;278(5342):1464-6.
- (8) Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M, Fujii K, Nakamura T, Ookubo T, et al. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* 1998 Aug 7;281(5378):832-5.
- (9) Sander EE, van Delft S, ten Klooster JP, Reid T, van der Kammen RA, Michiels F, et al. Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* 1998 Nov 30;143(5):1385-98.
- (10) Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 1997 Dec 11;390(6660):632-6.
- (11) Engers R, Springer E, Michiels F, Collard JG, Gabbert HE. Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J Biol Chem* 2001 Nov 9;276(45):41889-97.
- (12) Engers R, Springer E, Kehren V, Simic T, Young DA, Beier J, et al. Rac upregulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression by redox-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase signaling. *FEBS J* 2006 Sep 19;273:4754-69.
- (13) Shan D, Chen L, Njardarson JT, Gaul C, Ma X, Danishefsky SJ, et al. Synthetic analogues of migrastatin that inhibit mammary tumor metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Mar 8;102(10):3772-6.
- (14) van Leeuwen FN, van der Kammen RA, Habets GG, Collard JG. Oncogenic activity of Tiam1 and Rac1 in NIH3T3 cells. *Oncogene* 1995 Dec 7;11(11):2215-21.
- (15) Michiels F, Stam JC, Hordijk PL, van der Kammen RA, Salinas PC, Feltkamp CA, et al. Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation. *J Cell Biol* 1997 Apr 21;137(2):387-98.

- (16) Braga VM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* 1997 Jun 16;137(6):1421-31.
- (17) Kuroda S, Fukata M, Fujii K, Nakamura T, Izawa I, Kaibuchi K. Regulation of cell-cell adhesion of MDCK cells by Cdc42 and Rac1 small GTPases. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Nov 17;240(2):430-5.
- (18) Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* 1997 Nov 17;139(4):1047-59.
- (19) Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Toker A, Mercurio AM. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 1997 Dec 26;91(7):949-60.
- (20) Attoub S, Noe V, Pirola L, Bruyneel E, Chastre E, Mareel M, et al. Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *FASEB J* 2000 Nov;14(14):2329-38.
- (21) Braga VM, Del Maschio A, Machesky L, Dejana E. Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell* 1999 Jan;10(1):9-22.
- (22) Braga VM, Betson M, Li X, Lamarche-Vane N. Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin- dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol Biol Cell* 2000 Nov;11(11):3703-21.
- (23) Mertens AE, Pegtel DM, Collard JG. Tiam1 takes PART in cell polarity. *Trends Cell Biol* 2006 Jun;16(6):308-16.
- (24) Rygiel TP, Mertens AE, Strumane K, van der KR, Collard JG. The Rac activator Tiam1 prevents keratinocyte apoptosis by controlling ROS-mediated ERK phosphorylation. *J Cell Sci* 2008 Apr 15;121(Pt 8):1183-92.
- (25) Qiu RG, Chen J, Kirn D, McCormick F, Symons M. An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 1995 Mar 30;374(6521):457-9.
- (26) Malliri A, van der Kammen RA, Clark K, van d, V, Michiels F, Collard JG. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* 2002 Jun 20;417(6891):867-71.
- (27) Malliri A, Rygiel TP, van der Kammen RA, Song JY, Engers R, Hurlstone AF, et al. The rac activator Tiam1 is a Wnt-responsive gene that modifies intestinal tumor development. *J Biol Chem* 2006 Jan 6;281(1):543-8.
- (28) Strumane K, Rygiel T, van d, V, Collard JG. Tiam1-deficiency impairs mammary tumor formation in MMTV-c-neu but not in MMTV-c-myc mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009 Jan;135(1):69-80.
- (29) Engers R, Mueller M, Walter A, Collard JG, Willers R, Gabbert HE. Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinomas. *Br J Cancer* 2006 Oct 23;95(8):1081-6.
- (30) Engers R, Zwaka TP, Gohr L, Weber A, Gerharz CD, Gabbert HE. Tiam1 mutations in human renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2000;88(3):369-76.
- (31) Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem* 1989 Oct 5;264(28):16378-82.
- (32) Gu Y, Byrne MC, Paronavitana NC, Aronow B, Siefring JE, D'Souza M, et al. Rac2, a hematopoiesis-specific Rho GTPase, specifically regulates mast cell protease gene expression in bone marrow-derived mast cells. *Mol Cell Biol* 2002 Nov;22(21):7645-57.

-
- (33) Croker BA, Handman E, Hayball JD, Baldwin TM, Voigt V, Cluse LA, et al. Rac2-deficient mice display perturbed T-cell distribution and chemotaxis, but only minor abnormalities in T(H)1 responses. *Immunol Cell Biol* 2002 Jun;80(3):231-40.
- (34) Croker BA, Tarlinton DM, Cluse LA, Tuxen AJ, Light A, Yang FC, et al. The Rac2 guanosine triphosphatase regulates B lymphocyte antigen receptor responses and chemotaxis and is required for establishment of B-1a and marginal zone B lymphocytes. *J Immunol* 2002 Apr 1;168(7):3376-86.
- (35) Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, Siefring JE, Williams EP, Jasti AC, et al. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* 2003 Oct 17;302(5644):445-9.
- (36) Carstanjen D, Yamauchi A, Koornneef A, Zang H, Filippi MD, Harris C, et al. Rac2 regulates neutrophil chemotaxis, superoxide production, and myeloid colony formation through multiple distinct effector pathways. *J Immunol* 2005 Apr 15;174(8):4613-20.
- (37) Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem* 1997 Aug 15;272(33):20384-8.
- (38) Baugher PJ, Krishnamoorthy L, Price JE, Dharmawardhane SF. Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7(6):R965-R974.
- (39) Chan AY, Coniglio SJ, Chuang YY, Michaelson D, Knaus UG, Philips MR, et al. Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene* 2005 Jul 18.
- (40) Joyce PL, Cox AD. Rac1 and Rac3 are targets for geranylgeranyltransferase I inhibitor-mediated inhibition of signaling, transformation, and membrane ruffling. *Cancer Res* 2003 Nov 15;63(22):7959-67.
- (41) Mira JP, Benard V, Groffen J, Sanders LC, Knaus UG. Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Jan 4;97(1):185-9.
- (42) Finkielstein CV, Overduin M, Capelluto DG. Cell migration and signaling specificity is determined by the phosphatidylserine recognition motif of Rac1. *J Biol Chem* 2006 Sep 15;281(37):27317-26.
- (43) Corbetta S, Gualdoni S, Albertinazzi C, Paris S, Croci L, Consalez GG, et al. Generation and characterization of Rac3 knockout mice. *Mol Cell Biol* 2005 Jul;25(13):5763-76.
- (44) Sugihara K, Nakatsuji N, Nakamura K, Nakao K, Hashimoto R, Otani H, et al. Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 1998 Dec 31;17(26):3427-33.
- (45) Hajdo-Milasinovic A, Ellenbroek SIJ, van Es S, van der Vaart B, Collard JG. Rac1 and Rac3 have opposing functions in cell adhesion and neuronal differentiation. *J Cell Sci* 2007;in press.
- (46) Frost JA, Steen H, Shapiro P, Lewis T, Ahn N, Shaw PE, et al. Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *EMBO J* 1997 Nov 3;16(21):6426-38.
- (47) Frost JA, Xu S, Hutchison MR, Marcus S, Cobb MH. Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol Cell Biol* 1996 Jul;16(7):3707-13.
- (48) Sulciner DJ, Irani K, Yu ZX, Ferrans VJ, Goldschmidt CP, Finkel T. rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 1996 Dec;16(12):7115-21.

-
- (49) Westwick JK, Lambert QT, Clark GJ, Symons M, Van Aelst L, Pestell RG, et al. Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* 1997 Mar;17(3):1324-35.
- (50) Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 1998 May 8;280(5365):898-902.
- (51) Woo CH, Lee ZW, Kim BC, Ha KS, Kim JH. Involvement of cytosolic phospholipase A2, and the subsequent release of arachidonic acid, in signalling by rac for the generation of intracellular reactive oxygen species in rat-2 fibroblasts. *Biochem J* 2000 Jun 15;348 Pt 3:525-30.
- (52) Keller PJ, Gable CM, Wing MR, Cox AD. Rac3-mediated transformation requires multiple effector pathways. *Cancer Res* 2005 Nov 1;65(21):9883-90.
- (53) Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002; 25;108(2):171-82.
- (54) Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994;265(5181):2088-90
- (55) Henderson BR: Regulation of BRCA1, BRCA2 and BARD1 intracellular trafficking, *Bioessays*. 2005;27(9):884-93.
- (56) Marmorstein LY, Ouchi T, Aaronson SA: The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov10; 95(23):13869-74
- (57) Wang SC, Lin SH, Su LK, Hung MC. Changes in BRCA2 expression during progression of the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;234(1):247-51.
- (58) Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet*. 2008;124(1):31-42
- (59) Wang SC, Shao R, Pao AY, Zhang S, Hung MC, Su LK. Inhibition of cancer cell growth by BRCA2. *Cancer Res*. 2002;62(5):1311-4.
- (60) Tian XX, Rai D, Li J, Zou C, Bai Y, Wazer D, Band V, Gao QBRCA2 suppresses cell proliferation via stabilizing MAGE-D1. *Cancer Res*.;65(11):4747-53
- (61) Moro L, Arbini AA, Yao JL, di Sant'Agnese PA, Marra E, Greco M. Loss of BRCA2 promotes prostate cancer cell invasion through up-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Cancer Sci*. 2008;99(3):553-63.
- (62) Skibbens RV. Cell biology of cancer: BRCA1 and sister chromatid pairing reactions? *Cell Cycle*. 2008;7(4):449-52.
- (63) Chen Y, Farmer AA, Chen CF, Jones DC, Chen PL, Lee WH. BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. *Cancer Res*. 1996;56(14):3168-72
- (64) Gudas JM, Li T, Nguyen H, Jensen D, Rauscher FJ 3rd, Cowan KH. Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells. *Cell Growth Differ*. 1996;7(6):717-23
- (65) Vaughn JP, Davis PL, Jarboe MD, Huper G, Evans AC, Wiseman RW, Berchuck A, Iglehart JD, Futreal PA, Marks JR. BRCA1 expression is induced before DNA synthesis in both normal and tumor-derived breast cells. *Cell Growth Differ*. 1996;7(6):711-5
- (66) Boulton SJ. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 5):633-45.
- (67) Deng CX. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(5):1416-26.

-
- (68) Xu B, Kim St, Kastan MB. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol*. 2001;21(10):3445-50.
- (69) Hartman AR, Ford JM. BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet*. 2002;32(1):180-4.
- (70) Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;266(5182):66-71
- (71) Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium *Am J Hum Genet*. 1995;56(1):265-71
- (72) Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 1997;336(20):1401-8
- (73) Braga VM, Del Maschio A, Machesky L, Dejana E. Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell* 1999;10:9-22.
- (74) Sander EE, van Delft S, ten Klooster JP, Reid T, van der Kammen RA, Michiels F, Collard JG. Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* 1998;143:1385-98.
- (75) Mertens AE, Roovers RC, Collard JG. Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Lett*. 2003 Jul 3;546(1):11-6.
- (76) Minard ME, Kim LS, Price JE, Gallick GE. The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression, *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Mar;84(1):21-32
- (77) Mareel MM, Van Roy FM, Bracke ME. How and when do tumor cells metastasize?, *Crit Rev Oncog*. 1993;4(5) : 559-94.
- (78) Engers R, Gabbert HE. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications, *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000 Dec;126(12) : 682-92
- (79) Gabbert H: Mechanisms of tumor invasion. evidence from in vivo observations, *Cancer Metastasis Rev*. 1985;4(4):293-309
- (80) Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation, *Cancer Res*. 1991 Sep 15;51(18 Suppl):5054s-5059s
- (81) Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis, *Cancer*. 1997 Oct 15;80(8 Suppl):1529-37
- (82) Kohn EC, Liotta LA. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention, *Cancer Res*. 1995 May 1;55(9):1856-62
- (83) Rosen EM, Fan S, Ma Y. BRCA1 regulation of transcription. *Cancer Lett*. 2006 May 18;236(2):175-85. Epub 2005 Jun 21..
- (84) Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID. BRCA1 gene in breast cancer. *J Cell Physiol*. 2003 Jul;196(1):19-41
- (85) Beger C, Pierce LN, Kruger M, Marcusson EG, Robbins JM, Welch P, Welch PJ, Welte K, King MC, Barber JR, Wong-Staal F. Identification of Id4 as a regulator of BRCA1 expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 2;98(1):130-5
- (86) Arizti P, Fang L, Park I, Yin Y, Solomon E, Ouchi T, Aaronson SA, Lee SW. Tumor suppressor p53 is required to modulate BRCA1 expression. *Mol Cell Biol*. 2000 Oct;20(20):7450-9

-
- (87) MacLachlan TK, Dash BC, Dicker DT, El-Deiry WS. Repression of BRCA1 through a feedback loop involving p53. *J Biol Chem*. 2000 Oct 13;275(41):31869-75
- (88) Yang Q, Sakurai T, Mori I, Yoshimura G, Nakamura M, Nakamura Y, Suzuma T, Tamaki T, Umemura T, Kakudo K. Prognostic significance of BRCA1 expression in Japanese sporadic breast carcinomas. *Cancer*. 2001 Jul 1;92(1):54-60
- (89) Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet*. 1995 Apr;9(4):444-50
- (90) Lozano E, Betson M, Braga VM: Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion, *Bioessays*. 2003 May;25(5):452-63
- (91) Tripathi MK, Misra S, Khedkar SV, Hamilton N, Irvin-Wilson C, Sharan C, Sealy L, Chaudhuri G. Regulation of BRCA2 gene expression by the SLUG repressor protein in human breast cells. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):17163-71.
- (92) Moro L, Arbini AA, Marra E, Greco M. Up-regulation of Skp2 after prostate cancer cell adhesion to basement membranes results in BRCA2 degradation and cell proliferation. *J Biol Chem*. 2006 Aug 4;281(31):22100-7.
- (93) Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Aug 15;92(17):7686-9.
- (94) Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 1998 Jul 17;273(29):18623-32.
- (95) Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Nov 20;98(24):13681-6.
- (96) Simon C, Goepfert H, Boyd D. Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res* 1998 Mar 15;58(6):1135-9.
- (97) Gassen M, Youdim MBH. Free radical scavengers: chemical concepts and clinical relevance. *J Neural Transm* 1999;56 [Suppl]:193-210.
- (98) Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994 Feb 18;269(7):5241-8.
- (99) Fleming IN, Gray A, Downes CP. Regulation of the Rac1-specific exchange factor Tiam1 involves both phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent components. *Biochem J* 2000 Oct 1;351(Pt 1):173-82.
- (100) Sheetz MP, Felsenfeld D, Galbraith CG, Choquet D. Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp*. 1999;65:233-43
- (101) Ray JM, Stetler-Stevenson WG: The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis, *Eur Respir J*. 1994 Nov;7(11):2062-72
- (102) Coussens LM, Werb Z: Matrix metalloproteinases and the development of cancer, *Chem Biol*. 1996 Nov;3(11):895-904
- (103) Kelly T, Yan Y, Osborne RL, Athota AB, Rozypal TL, Colclasure JC, Chu WS: Proteolysis of extracellular matrix by invadopodia facilitates human breast cancer cell invasion and is mediated by matrix metalloproteinases, *Clin Exp Metastasis*. 1998 Aug;16(6):501-12

-
- (104) Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP: Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions, *Eur J Cell Biol.* 1997 Oct;74(2):111-22
- (105) Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM: Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2, *J Biol Chem.* 1997 Jun 13;272(24):15496-500
- (106) Butler GS, Apte SS, Willenbrock F, Murphy G: Human tissue inhibitor of metalloproteinases 3 interacts with both the N- and C-terminal domains of gelatinases A and B. Regulation by polyanions, *J Biol Chem.* 1999 Apr 16;274(16):10846-51
- (107) Wang M, Liu YE, Greene J, Sheng S, Fuchs A, Rosen EM, Shi YE: Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4, *Oncogene.* 1997 Jun 12;14(23):2767-74
- (108) Baker AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Newby AC: Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3, *Br J Cancer.* 1999 Mar;79(9-10):1347-55
- (109) Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P: Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity, *Biotechniques.* 1997 Mar;22(3):474-6, 478-81
- (110) Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene.* 2006 Sep 25;25(43):5864-74.
- (111) Karran P: DNA double strand break repair in mammalian cells, *Curr Opin Genet Dev.* 2000 Apr;10(2):144-50
- (112) Khanna KK, Jackson SP: DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, *Nat Genet.* 2001 Mar;27(3):247-54
- (113) van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R: Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection, *Nat Rev Genet.* 2001 Mar;2(3):196-206
- (114) Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, Sands A, Eichele G, Hasty P, Bradley A: Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2, *Nature.* 1997 Apr 24;386(6627):804-10
- (115) Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL: RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2, *J Biol Chem.* 1997 Dec 19;272(51):31941-4
- (116) Goodsell DS: The molecular perspective: RAD51 and BRCA2, *Oncologist.* 2005 Aug;10(7):555-6
- (117) Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. : Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 *Nature.* 1995 Dec 21-28;378(6559):789-92
- (118) Yoshida K, Miki Y: Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage, *Cancer Sci.* 2004 Nov;95(11):866-71
- (119) Lin HR, Ting NS, Qin J, Lee WH: M phase-specific phosphorylation of BRCA2 by Polo-like kinase 1 correlates with the dissociation of the BRCA2-P/CAF complex, *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):35979-87.
- (120) Holt JT, Thompson ME, Szabo C, Robinson-Benion C, Arteaga CL, King MC, Jensen RA. Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. *Nat Genet.* 1996 Mar;12(3):298-302.

-
- (121) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977, *Biotechnology*. 1992;24:104-8
- (122) Albin A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells, *Cancer Res*. 1987 Jun 15;47(12):3239-45
- (123) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 1976 72, 248-254
- (124) Compton SJ, Jones CG: Mechanism of dye response and interference in Bradford protein Assay, *Anal Biochem*. 1985 Dec;151(2):369-74
- (125) Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003 Jan 20;160(2):267-77.
- (126) Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2007 Aug;9(8):893-904.
- (127) Renart J, Reiser J, Stark GR: Transfer of Proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1979, 76, 3116-3120
- (128) Weinberg, R. A. and Hanahan, D, The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- (129) Pitot HC, Dragan YP, Teeguarden J, Hsia S, Campbell H Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. *Toxicol Pathol*. 1996 Jan-Feb;24(1):119-28
- (130) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5
- (131) Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV Jr: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, *Biochem Biophys Res Commun*. 1967 Sep 7;28(5):815-20
- (132) Prescott DM und Flexer AS. Krebs, Fehlsteuerung von Zellen. Ursachen und Konsequenzen. *Spektrum der Wissenschaften*, 1990.
- (133) Knudson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971, 68:820-823.
- (134) Vissac C., Peffault De Latour M., Communal Y., Bignon Y.-J., Bernard-Gallon D.J. Expression of BRCA1 and BRCA2 in different tumor cell lines with various growth status. *Clinica Chimica Acta*, Volume 320, Number 1, June 2002, pp. 101-110(10)
- (135) Liu L, Xu AG, Zhang QL, Zhang YF, Ding YQ. [Effect of Tiam1 overexpression on proliferation and metastatic potential of human colorectal cancer]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2007 Jun;36(6):390-3
- (136) Wang J, Bian C, Li J, Couch FJ, Wu K, Zhao RC. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 down-regulates BRCA2 expression through the BRCA2 promoter. *J Biol Chem*. 2008 Dec 26;283(52):36249-56.
- (137) Zhang XM, Ding Y, Chen JZ, Jin H, Yu LN, Li YF, Ding YQ. [Overexpression of Tiam1 gene and its relationship with invasive and metastatic ability of nasopharyngeal carcinoma.] *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2009 Apr;38(4):268-72
- (138) Schmidt BA, Rose A, Steinhoff C, Strohmeyer T, Hartmann M, Ackermann R. Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down-regulation of

- cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors. *Cancer Res.* 2001 May 15;61(10):4214-21
- (139) Wang SC, Hung MC Cytoplasmic/Nuclear Shuttling and Tumor Progression *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Nov;1059:11-5. Review.
- (140) Jethwa P, Naqvi M, Hardy RG, Hotchin NA, Roberts S, Spychal R, Tselepis C. Overexpression of Slug is associated with malignant progression of esophageal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008 Feb 21;14(7):1044-52
- (141) Choi J, Park SY, Joo CK. Transforming growth factor-beta1 represses E-cadherin production via slug expression in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Jun;48(6):2708-18
- (142) Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschläger M. Skp2 inversely correlates with p27 and tuberlin in transformed cells. *Amino Acids.* 2009 Jul;37(2):257-62.
- (143) Gao D, Inuzuka H, Tseng A, Chin RY, Toker A, Wei W. Phosphorylation by Akt1 promotes cytoplasmic localization of Skp2 and impairs APCcdh1-mediated Skp2 destruction. *Nat Cell Biol.* 2009 Apr;11(4):397-408.
- (144) Hojo Y, Saito Y, Tanimoto T, Hoefen RJ, Baines CP, Yamamoto K, Haendeler J, Asmis R, Berk BC. Fluid shear stress attenuates hydrogen peroxide-induced c-Jun NH2-terminal kinase activation via a glutathione reductase-mediated mechanism. *Circ Res.* 2002 Oct 18;91(8):712-8.
- (145) Song X, Xu A, Pan W, Wallin B, Kivlin R, Lu S, Cao C, Bi Z, Wan Y. Minocycline protects melanocytes against H2O2-induced cell death via JNK and p38 MAPK pathways. *Int J Mol Med.* 2008 Jul;22(1):9-16
- (146) Milner J, Ponder B, Hughes-Davies L, Seltnann M, Kouzarides T. Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature.* 1997 Apr 24;386(6627):772-3.
- (147) May GH, Harris F, Gillespie D, Black DM. The BRCA2 transactivation domain does not interact with JNK. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999 Aug;25(4):407-9.
- (148) Yuen MT, Leung LK, Wang J, Wong YC, Chan FL. Enhanced induction of prostatic dysplasia and carcinoma in Noble rat model by combination of neonatal estrogen exposure and hormonal treatments at adulthood. *Int J Oncol.* 2005 Dec;27(6):1685-95
- (149) Sun X, Gong Y, Rao MS, Badve S. Loss of BRCA1 expression in sporadic male breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Jan;71(1):1-7
- (150) Andres JL, Fan S, Turkel GJ, Wang JA, Twu NF, Yuan RQ, Lamszus K, Goldberg ID, Rosen EM. Regulation of BRCA1 and BRCA2 expression in human breast cancer cells by DNA-damaging agents. *Oncogene.* 1998 Apr 30;16(17):2229-41
- (151) Yuan R, Fan S, Wang JA, Meng Q, Ma Y, Schreiber D, Goldberg ID, Rosen EM. Coordinate alterations in the expression of BRCA1, BRCA2, p300, and Rad51 in response to genotoxic and other stresses in human prostate cancer cells. *Prostate.* 1999 Jun 15;40(1):37-49
- (152) Rajan JV, Wang M, Marquis ST, Chodosh LA. Brca2 is coordinately regulated with Brca1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 12;93(23):13078-83
- (153) Rao VN, Shao N, Ahmad M, Reddy ES. Antisense RNA to the putative tumor suppressor gene BRCA1 transforms mouse fibroblasts. *Oncogene.* 1996 Feb 1;12(3):523-8.
- (154) Moro L, Arbini AA, Marra E, Greco M. Constitutive activation of MAPK/ERK inhibits prostate cancer cell proliferation through upregulation of BRCA2. *Int J Oncol.* 2007 Jan;30(1):217-24

-
- (155) Moro L, Arbini AA, Marra E, Greco M. Down-regulation of BRCA2 expression by collagen type I promotes prostate cancer cell proliferation. *J Biol Chem*. 2005 Jun 10;280(23):22482-91
- (156) Servitja JM, Marinissen MJ, Sodhi A, Bustelo XR, Gutkind JS. Rac1 function is required for Src-induced transformation. Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5;278(36):34339-46.
- (157) Liu L, Zhang Q, Zhang Y, Wang S, Ding Y. Lentivirus-mediated silencing of Tiam1 gene influences multiple functions of a human colorectal cancer cell line. *Neoplasia*. 2006 Nov;8(11):917-24
- (158) Kim DS, Jeon OH, Lee HD, Yoo KH, Kim DS. Integrin alphavbeta3-mediated transcriptional regulation of TIMP-1 in a human ovarian cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Dec 12;377(2):479-83.
- (159) Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):673-87
- (160) Junker JL, Heine UI. Effect of adhesion factors fibronectin, laminin, and type IV collagen on spreading and growth of transformed and control rat liver epithelial cells. *Cancer Res*. 1987 Jul 15;47(14):3802-7.
- (161) Harkin DP, Bean JM, Miklos D, Song YH, Truong VB, Englert C, Christians FC, Ellisen LW, Maheswaran S, Oliner JD, Haber DA. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*. 1999 May 28;97(5):575-86
- (162) Lafarge S, Sylvain V, Ferrara M, Bignon YJ. Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene*. 2001 Oct 4;20(45):6597-606
- (163) Xiang T, Ohashi A, Huang Y, Pandita TK, Ludwig T, Powell SN, Yang Q. Negative Regulation of AKT Activation by BRCA1. *Cancer Res*. 2008 Dec 15;68(24):10040-4
- (164) Hinton CV, Fitzgerald LD, Thompson ME. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling enhances nuclear localization and transcriptional activity of BRCA1. *Exp Cell Res*. 2007 May 15;313(9):1735-44
- (165) Gilmore PM, McCabe N, Quinn JE, Kennedy RD, Gorski JJ, Andrews HN, McWilliams S, Carty M, Mullan PB, Duprex WP, Liu ET, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1 interacts with and is required for paclitaxel-induced activation of mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Cancer Res*. 2004 Jun 15;64(12):4148-54
- (166) Yeh S, Hu YC, Rahman M, Lin HK, Hsu CL, Ting HJ, Kang HY, Chang C. Increase of androgen-induced cell death and androgen receptor transactivation by BRCA1 in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 10;97(21):11256-61.
- (167) Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID. BRCA1 in hormone-responsive cancers. *Trends Endocrinol Metab*. 2003 Oct;14(8):378-85.
- (168) Fan S, Wang JA, Yuan RQ, Ma YX, Meng Q, Erdos MR, Brody LC, Goldberg ID, Rosen EM. BRCA1 as a potential human prostate tumor suppressor: modulation of proliferation, damage responses and expression of cell regulatory proteins. *Oncogene*. 1998 Jun 11;16(23):3069-82
- (169) Schayek H, Haugk K, Sun S, True LD, Plymate SR, Werner H. Tumor suppressor BRCA1 is expressed in prostate cancer and controls insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) gene transcription in an androgen receptor-dependent manner. *Clin Cancer Res*. 2009 Mar 1;15(5):1558-65

- (170) Wu YQ, Peng G. Expression of Tiam1 in breast carcinomas and its clinical significance] *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009 Nov;29(11):2324-6.
- (171) Rooney C, White G, Nazgiewicz A, Woodcock SA, Anderson KI, Ballestrem C, Malliri A., The Rac activator STEF (Tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly, *EMBO Rep*. 2010 Apr;11(4):292-8.
- (172) Hennessy BT, Timms KM, Carey MS, Gutin A, Meyer LA, Flake DD 2nd, Abkevich V, Potter J, Pruss D, Glenn P, Li Y, Li J, Gonzalez-Angulo AM, McCune KS, Markman M, Broaddus RR, Lanchbury JS, Lu KH, Mills GB, Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer, *J Clin Oncol*. 2010 Aug 1;28(22):3570-6.
- (173) Malchinkhuu E, Sato K, Horiuchi Y, Mogi C, Ohwada S, Ishiuchi S, Saito N, Kurose H, Tomura H, Okajima F., Role of p38 mitogen-activated kinase and c-Jun terminal kinase in migration response to lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate in glioma cells., *Oncogene*. 2005 Oct 6;24(44):6676-88.
- (174) Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions *Cell*. 2003 Feb 21;112(4):535-48
- (175) Malliri A, van Es S, Huveneers S, Collard JG The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance of cadherin-based adhesions. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16;279(29):30092-8
- (176) Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998 Mar 6;273(10):5858-68.
- (177) Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Apr;12(2):162-9. Review
- (178) Srivastava N, Gochhait S, de Boer P, Bamezai RN. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutat Res*. 2009 Mar-Jun;681(2-3):180-8
- (179) van Attikum H, Gasser SM. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol*. 2009 May;19(5):207-17.
- (180) Panier S, Durocher D. Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 2009 Apr 5;8(4):436-43
- (181) Agostini B, Wieland T. Decreased phalloidin toxicity in rats pretreated with D-galactosamine. *Naturwissenschaften*. 1977 Dec;64(12):649.
- (182) Liotta LA. An attractive force in metastasis. *Nature*. 2001 Mar;410(6824):24-5
- (183) Friedl P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Feb;16(1):14-23.
- (184) Friedl P, Wolf K. Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res*. 2008 Sep 15;68(18):7247-9.
- (185) Wolf K, Friedl P. Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br J Dermatol*. 2006 May;154 Suppl 1:11-5.
- (186) Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Dec;9(12):1392-400
- (187) Gaggioli C. Collective invasion of carcinoma cells: when the fibroblasts take the lead. *Cell Adh Migr*. 2008 Jan;2(1):45-7
- (188) Wagner EF, Nebreda AR., Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development., *Nat Rev Cancer*. 2009 Aug;9(8):537-49.

- (189) Shepherd TR, Klaus SM, Liu X, Ramaswamy S, DeMali KA, Fuentes EJ., The Tiam1 PDZ domain couples to Syndecan1 and promotes cell-matrix adhesion., *J Mol Biol.* 2010 May 21;398(5):730-46
- (190) Desai LP, White SR, Waters CM., Cyclic mechanical stretch decreases cell migration by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase- and focal adhesion kinase-mediated JNK1 activation. *J Biol Chem.* 2010 Feb 12;285(7):4511-9
- (191) O'Donovan PJ, Livingston DM., BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis.* 2010 Jun;31(6):961-7.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| AP-1 | Aktivatorprotein 1 |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| bp | basenpaar |
| BRCA1/2 | Breastcancer susceptibility gene |
| BSA | Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin) |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca | circa |
| CamKII | Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige ProteinkinaseII |
| CC | Coiled-Coil-Region |
| cDNA | complementary DNA |
| DBS | Doppelstrangbruch |
| d. h. | das heißt |
| DH | Dbl homologe Domäne |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | enhanced chemiluminiscence |
| EDTA | Etylendiamintetraacetic acid |
| ERK 1,2 | Extracellular-signal Regulated Kinasen 1,2 |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| fwd | forward |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | hour |
| HR | homologe Reparatur |
| JNK | c-Jun NH ₂ -terminale Kinase |
| kb | Kilobasenpaar |

| | |
|-----------|--|
| kDa | Kilodalton (Molekularmasse) |
| mA | milli Ampere |
| MDCK | Madin-Darby canine kidney |
| MEK1,2 | MAPK- und ERK-Kinase |
| MLK | mixed lineage kinases |
| MMP | Matrix-Metalloproteinasen |
| MMTV | Maus-Mammatumovirus |
| mRNA | messenger-RNA |
| Myr | Myristoylierungsstelle |
| N | Normalgewebe |
| NHEJ | nonhomologous end joining |
| NLS | Kernlokalisierungssequenz |
| nm | Nanometer |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| P/CAF | p300/CBP-associated factor |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| PH-Domäne | Pleckstrin homologe Domäne |
| PI3 | Phosphatidyl-Inositol-3 |
| PKC | Proteinkinase C |
| Ras | Rat sarcoma |
| RBD | Ras bindende Domäne |
| rev | reverse |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| rpm | Rotation pro Minute (Einheit der Rotationsgeschwindigkeit) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | reverse transcriptase Polymerasekettenreaktion |
| SDS | Sodiumdodecylsulfate |
| Skp2 | S-phase kinase-associated protein 2 |
| SRF | serum response factor |
| SSA | single-strand annealing |
| T | Tumorgewebe |
| TAD | transkriptionelle Aktivierungsdomäne |

| | |
|-------|--|
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| Tiam1 | T-lymphoma invasion and metastasis gene1 |
| TIMP | tissue inhibitors of metalloproteinases |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| vgl | vergleiche |
| z. B. | zum Beispiel |

9.2 Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen

Eva Müller

9.3 Danksagung

An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank:

Herrn Prof. Dr. Wagner für die Übernahme der Betreuung

Herrn Prof. Dr. Rainer Engers für die Überlassung des interessanten Themas, seine Betreuung und die schöne Zeit in seiner Arbeitsgruppe

Frau Dr. Slava Ziegler für die sehr gute Einarbeitung und ihre ständige Bereitschaft allen bei der Lösung ihrer Fragestellungen zu helfen

Frau Dr. Michelé Hoffmann, auch sie hatte immer ein offenes Ohr und war eine gute Hilfe bei der Lösung diverser Fragestellungen

Allen technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Engers für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Untersuchungen

Sandra, Anne, Friederike, Vera und allen anderen für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft, ohne sie wäre die Zeit im Labor nicht so toll gewesen

Meinem Freund Robért, der immer an meiner Seite gewesen ist, jede Menge Geduld und Verständnis für mich hatte auch wenn es besonders stressig wurde und eine große Hilfe bei der Formatierung der Arbeit war

Meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht hat und mich immer unterstützt hat