

AUS DEM INSTITUT FÜR PATHOLOGIE
DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS DÜSSELDORF
DIREKTOR: PROF. DR. MED. H. E. GABBERT

Einfluss von Vinexin- β und Galectin-1 auf die Tiam1-abhängige Signalweitergabe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sandra Karatas

aus Wuppertal

Düsseldorf 2010

Aus dem Institut für Pathologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. med. Rainer Engers
Koreferent: Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung:

Für Bora und für meine Familie

Also lautet ein Beschluß:
Daß der Mensch was lernen muß.
Nicht allein das Abc
Bringt den Menschen in die Höh';
Nicht allein in Schreiben, Lesen
Übt sich ein vernünftig Wesen;
Nicht allein in Rechnungssachen
Soll der Mensch sich Mühe machen,
Sondern auch der Weisheit Lehren
Muß man mit Vergnügen hören.

Wilhelm Busch, Max und Moritz (1865) - Vierter Streich

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Krebs.....	1
1.2	Ursachen der Tumorgenese	1
1.2.1	Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene.....	2
1.2.2	Tumorinvasion und Metastasierung	3
1.3	Tiam1.....	5
1.3.1	Struktur von Tiam1.....	6
1.3.2	Funktionelle Bedeutung von Tiam1	7
1.3.3	Regulation und Aktivierung von Tiam1	10
1.4	Die Vinexin-Familie	13
1.4.1	Vinexin- β	14
1.4.2	Funktionelle Bedeutung von Vinexin- β	15
1.5	Überblick über die Galectin-Familie	18
1.5.1	Galectin-1	19
1.5.2	Funktionelle Bedeutung von Galectin-1.....	21
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
3	MATERIAL	25
3.1	Laborgeräte	25
3.2	Verbrauchsmaterialien	26
3.3	Chemikalien	27
3.4	Puffer und Lösungen	27
3.5	Protein- und Nukleinsäurestandards.....	30
3.6	Vektoren.....	31
3.7	Konstrukte	31
3.8	Oligodesoxyribonukleotide	32
3.9	Enzyme	34
3.10	Antikörper	34

.....	Einleitung	
3.11	Kitsysteme	36
3.12	Nährmedien	36
3.13	Biologisches Material	37
3.14	Internetadressen / Webtools	38
4	METHODEN	39
4.1	Molekularbiologische Methoden	39
4.1.1	DNA-Konzentrationsbestimmung	39
4.1.2	Polymerase-Kettenreaction (PCR)	39
4.1.3	Aufreinigung von PCR-Fragmenten	41
4.1.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	41
4.1.5	DNA-Hydrolyse mittels Restriktionsendonukleasen	42
4.1.6	Dephosphorylierung von DNA-Enden	42
4.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	42
4.1.8	Hybridisierung komplementärer Oligodesoxynukleotide	43
4.1.9	Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden	43
4.1.10	Sequenzierung	43
4.1.11	Klonierung von shRNA in pSUPER bzw. pRETROSUPER	44
4.1.12	RNA-Isolierung	47
4.1.13	RNA-Konzentrationsbestimmung	47
4.1.14	Reverse Transkription-PCR	47
4.1.15	Quantitative Real-Time PCR	48
4.2	Zellbiologische Methoden	50
4.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	50
4.2.2	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	51
4.2.3	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	52
4.2.4	Immuncytochemie und Fluoreszenzmikroskopie	53
4.2.5	Funktionelle Analysen	53
4.2.6	Zymographie	55
4.2.7	Dual-Luciferase®-Reporter-Gen-Assay	55
4.2.8	Durchflusszytometrie zur quantitativen Bestimmung von ROS	56
4.3	Proteinbiochemische Methoden	57
4.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	57
4.3.2	Co-Immunpräzipitation	58
4.3.3	Aktivitäts-Assays für die GTPasen Rac und Ras	59
4.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
4.3.5	Western Blot	60
4.3.6	Ponceau S-Färbung	61
4.3.7	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen	61
4.3.8	Entfernen von Antikörpern von einer Membran	62
4.4	Mikrobiologische Methoden	63
4.4.1	Anzucht von Bakterien	63
4.4.2	Herstellung kompetenter Bakterien	63
4.4.3	Transformation kompetenter Bakterien	63

.....	Einleitung	
4.4.4	Lagerung von Bakterien.....	64
4.4.5	Kolonie-PCR	64
4.4.6	Isolation von Plasmid-DNA	65
5	ERGEBNISSE.....	66
5.1	Untersuchung der Interaktion von Tiam1 und Vinexin-β.....	66
5.1.1	Nachweis der Bindungsspezifität von Tiam1 und Vinexin- β	66
5.1.2	Charakterisierung der Tiam1-Vinexin- β -Interaktion	69
5.1.3	Einfluss von Tiam1 und EGF auf die Interaktion von Vinexin- β mit Sos bzw. Vinexin- β und ERK1,2 ...	73
5.1.4	Einfluss von EGF auf die Tiam1-Vinexin- β -Interaktion	75
5.1.5	Einfluss von Vinexin- β auf die Tiam1-Ras-Interaktion.....	76
5.1.6	Einfluss von Vinexin- β auf die Tiam1-vermittelte Rac-Aktivierung	78
5.1.7	Funktionelle Relevanz der Tiam1-Vinexin- β -Interaktion im Hinblick auf die Regulation der Migration	90
5.2	Untersuchung der Interaktion von Tiam1 und Galectin-1.....	101
5.2.1	Nachweis der Bindungsspezifität von Tiam1 und Galectin-1	101
5.2.2	Charakterisierung der Tiam1-Galectin-1-Interaktion	104
5.2.3	Einfluss von Galectin-1 und EGF auf die Tiam1-Ras-Interaktion	109
5.2.4	Einfluss von EGF auf die Tiam1-Galectin-1-Interaktion.....	110
5.2.5	Einfluss von Tiam1 auf die Sekretion von Galectin-1	111
5.2.6	Einfluss von Galectin-1 auf die Tiam1-vermittelte Rac-Aktivierung.....	114
5.2.7	Untersuchungen zur funktionellen Relevanz der Tiam1-Galectin-1-Interaktion im Hinblick auf die Regulation der Zellmigration	123
6	DISKUSSION	132
6.1	Die Interaktion von Tiam1 mit Vinexin-β	132
6.1.1	Charakterisierung der Tiam1-Vinexin- β -Interaktion	133
6.1.2	Untersuchungen zur Funktion von Vinexin- β in der Signaltransduktion	135
6.1.3	Funktionelle Bedeutung der Tiam1-Vinexin- β -Interaktion für die Rac-vermittelte Signalweitergabe	138
6.1.4	Funktionelle Relevanz der Tiam1-Vinexin- β -Interaktion.....	147
6.2	Die Interaktion von Tiam1 mit Galectin-1	152
6.2.1	Charakterisierung der Tiam1-Galectin-1-Interaktion	152
6.2.2	Die Interaktion von Galectin-1, Tiam1 und Ras	154
6.2.3	Einfluss von Tiam1 auf die Sekretion von Galectin-1	155
6.2.4	Funktionelle Bedeutung der Tiam1-Galectin-1-Interaktion für die Rac-vermittelte Signalweitergabe	156
6.2.5	Funktionelle Relevanz der Tiam1-Galectin-1-Interaktion	158
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	163
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	167
9	ANHANG	182

1 Einleitung

1.1 Krebs

Der Begriff „*Karzinom*“ wurde ursprünglich durch den griechischen Arzt Hippokrates (460-370 v.Chr.) geprägt. Er beschrieb damit unheilbare Knoten und Geschwüre, die von erweiterten Blutgefäßen umgeben waren. Noch heute wird die lateinische Übersetzung „*Cancer*“ für bestimmte Krebsformen verwendet.

In Deutschland werden etwa ein Viertel aller Todesfälle durch Krebserkrankungen hervorgerufen. Damit ist Krebs heute nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Untersuchungen des Robert-Koch-Instituts weisen Prostata-, Brust- und Darmkrebs als die häufigsten Krebserkrankungen aus (Krebs in Deutschland, 2008).

Die Diagnose „Krebs“ stellt keine einheitliche Erkrankung dar, sondern ist vielmehr eine Bezeichnung für viele verschiedene Krankheitsformen, die sich durch ein unkontrolliertes und invasives Zellwachstum, Differenzierungsverlust und die unkontrollierte metastatische Verbreitung entarteter Zellen auszeichnen. Heute weiß man, dass Krebs eine genetische Krankheit ist, in der verschiedene Gene in ihrer Funktion fehlreguliert werden.

1.2 Ursachen der Tumorgenese

In normalen Geweben werden Prozesse, wie Zellproliferation und –differenzierung streng reguliert. Krebs entsteht aufgrund multipler genetischer Veränderungen, die der Zelle erlauben, sich den normalen molekularen Kontrollmechanismen für Proliferation, Differenzierung und Apoptose zu entziehen. Solche genetische Veränderungen können einerseits zum Verlust, zur strukturellen Veränderung, zur Überproduktion oder zur konstitutiven Aktivierung eines Proteins führen. Andererseits können z. B. durch Translokationen aber auch völlig neue Fusionsproteine entstehen (Henning, 1995). Sieht man von den vererbten Formen der Tumorentstehung ab, so entstehen die meisten Tumore aufgrund somatischer Mutationen. Im Prinzip ist zunächst einmal jede Zelle spontanen Mutationen unterworfen. Mit steigendem Alter oder unter dem Einfluss von Kanzerogenen, wie z. B. Tabakrauch oder UV-Strahlung, steigt jedoch die Mutationsrate. Gleichzeitig sinkt

aber die Effektivität zelleigener Reparatursysteme, so dass insgesamt das Risiko einer nicht korrigierten Mutation deutlich zunimmt. Im Rahmen der Krebsentstehung entgeht die Zelle oft mit der ersten Mutation dem zelleigenen Reparatursystem, so dass Mutationen entweder nicht oder nur noch fehlerhaft repariert werden. Kommen dann relevante Mutationen von Genen hinzu, die in die Kontrolle der Zellproliferation oder Apoptose eingebunden sind, kann dies zur Krebsentstehung führen. Diese Zellen verlieren ihre Fähigkeit der kontrollierten Proliferation und vermehren sich folglich ungehemmt. So entstandene gutartige (*benigne*) Tumore sind oft noch gut differenziert und wachsen am Ort der Entstehung. Erst durch weitere genetische Veränderungen entsteht dann ein bösartiger (*maligner*), wenig differenzierter Tumor, der in der Lage ist, aktiv in das angrenzende Gewebe einzuwandern und schließlich zu metastasieren. Laut Hanahan und Weinberg (2000) werden maligne Phänotypen durch sechs physiologische Veränderungen definiert: Autonomie in Bezug auf Wachstumssignale und Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren, Umgehen der Apoptose, unbegrenztes Proliferationspotential, anhaltende Angiogenese und Gewebeinvasion und -metastasierung.

1.2.1 Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene

Genetische Veränderungen während der Kanzerogenese betreffen grundsätzlich zwei Klassen von Genen: Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene. Proto-Onkogene kodieren für Proteine, die die Zellproliferation stimulieren, indem sie den Zellzyklus aktivieren, die Differenzierung inhibieren oder die Apoptose blockieren (Lüscher und Nordheim, 2006). Ihre kanzerogene Wirkung erhalten sie entweder durch intragenetische Mutationen, wie z. B. Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen, durch chromosomale Translokationen oder eine Fehlregulation der Expression in der Zelle. Eine Überexpression dieser Gene führt zu einer Induktion der konstitutiven Aktivität, welche in unkontrolliertem Wachstum von Zellen resultiert. Mutationen in Proto-Onkogenen sind dominant. Das bedeutet, dass das nicht mutierte Allel den Phänotyp des mutierten Allels nicht kompensieren kann. Diese Mutation führt zur Synthese eines aktiven Onkoproteins und somit zu einem Funktionsgewinn (engl. *gain of function*). Zu den Proto-Onkogenen gehören Gene, wie z. B. Wachstumsfaktoren (z. B. Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Wnt-1, einige Interleukine) bzw. deren Rezeptoren (z. B. EGF-Rezeptor), Transkriptionsfaktoren (c-Jun, c-Myc, c-Fos) und Proteine der Signaltransduktion (z. B. Ras-Proteine, Scr-Kinase, Abl-Kinase).

Im Gegensatz zu den Proto-Onkogenen hemmen die Tumorsuppressorgene das Zellwachstum (Henning, 2002). Sie sind außerdem an der Regulation der DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt. Mutationen in Tumorsuppressorgen führen zu einem Funktionsverlust (engl. *loss of function*) und fördern so die Tumورprogression (Henning, 2002). Da sie rezessiv sind, reicht normalerweise die Mutation eines Allels nicht aus, um das Gen zu inaktivieren. Vielmehr ist es für die Entstehung eines Tumors erforderlich, dass ein Allel verlorengeht (Verlust der Heterozygotie, engl. *loss of heterozygosity*, LOH), so dass dann eine Mutation in dem verbleibenden Allel ausreicht, um das Gen zu inaktivieren (Henning, 2002). Man kennt heute etwa 30 Tumorsuppressorgene mit unterschiedlichen Funktionen, unter anderem p53 (Apoptose), BRCA1, BRCA2, APC, Rb-1 (Zellteilung) und P-TEN (Zellmigration und Zellteilung). Die Inaktivierung, Fehlfunktion oder gar der Verlust der Tumorsuppressorgene sind kausal an der Tumorentwicklung beteiligt.

1.2.2 Tumorinvasion und Metastasierung

Tumormetastasierung ist ein sehr komplexer Prozess, der sowohl eine Interaktion der Tumorzellen untereinander aber auch die Interaktion mit dem umgebenen Wirtsgewebe einbezieht. Der erste Schritt zur Metastasierung ist die Invasion der Tumorzellen in das angrenzende Wirtsgewebe. Durch den Verlust Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsion sind einige Tumorzellen in der Lage, sich aus dem Tumerverband zu lösen (Tumor-Zell-Dissoziation). Durch Ausbildung von Pseudopodien und Lamellipodien (sog. „Scheinfüßchen“) können sie sich gezielt in eine bestimmte Richtung bewegen und das umgebene Wirtsgewebe aktiv infiltrieren (Invasion) (Engers *et al.*, 2000). Auf molekularer Ebene ist die Ausbildung von Pseudo-/Lamellipodien das Ergebnis koordinierter Actinpolymerisation, die im Wesentlichen durch die kleine Rho-ähnliche GTPase Rac vermittelt wird (Michiels *et al.*, 1995). Für die spezifische Interaktion der Zelle mit verschiedenen Substraten der extrazellulären Matrix (ECM), wie Laminin und Collagen, sind substratspezifische Oberflächenrezeptoren (Integrine) notwendig. Eine verringerte Expression dieser Rezeptoren führt zu einem Verlust dieser Wechselwirkungen. Während der Tumorinvasion müssen Tumorzellen die ECM, bestehend aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Filament-Proteinen, durchwandern. In vielen malignen Tumoren beobachtet man dabei eine gesteigerte proteolytische Aktivität und eine damit einhergehende proteolytische Degradation der ECM, die es den Tumorzellen ermöglicht in das Wirtsgewebe einzuwandern. Eine wichtige Gruppe proteolytischer Enzyme ist in diesem

Zusammenhang die Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Inhibiert werden diese durch spezifische TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*). Ein Ungleichgewicht zwischen den invasionsfördernden Proteasen und invasionshemmenden TIMPs zugunsten der MMPs führt zu einem invasiven Phänotyp (Engers *et al.*, 2000). Wandernde Tumorzellen bewegen sich bevorzugt in die Richtung der Blut- und Lymphgefäße. Durch erneute Bildung von proteolytischen Enzymen ist die Tumorzelle in der Lage, die Gefäßwand zu durchdringen (Intravasation). Mit dem Blut-/Lymphstrom gelangt sie dann passiv zu verschiedenen Organen, wobei viele Zellen so erst das Herz passieren und anschließend mit dem Blutstrom in die Kapillaren der Lunge gepumpt werden. Durch ihre Größe arretieren die Tumorzellen in kleineren Gefäßen des Zielorgans, wo sie dann das Gefäßsystem aktiv verlassen (Extravasation) und das umgebende Gewebe invadieren (Invasion). Damit ist die Lunge das Organ, in dem sich die meisten Metastasen bilden. Krebszellen aus dem Dickdarm metastasieren dagegen oft in die Leber. Im Zielorgan können die Zellen über Jahre und Jahrzehnte in der G_0 -Phase des Zellzyklus verbleiben (Tumorruhe oder stille Mikrometastasierung), bevor sie, stimuliert durch äußere Einflüsse, zu proliferieren beginnen und schließlich klinisch manifeste Metastasen bilden.

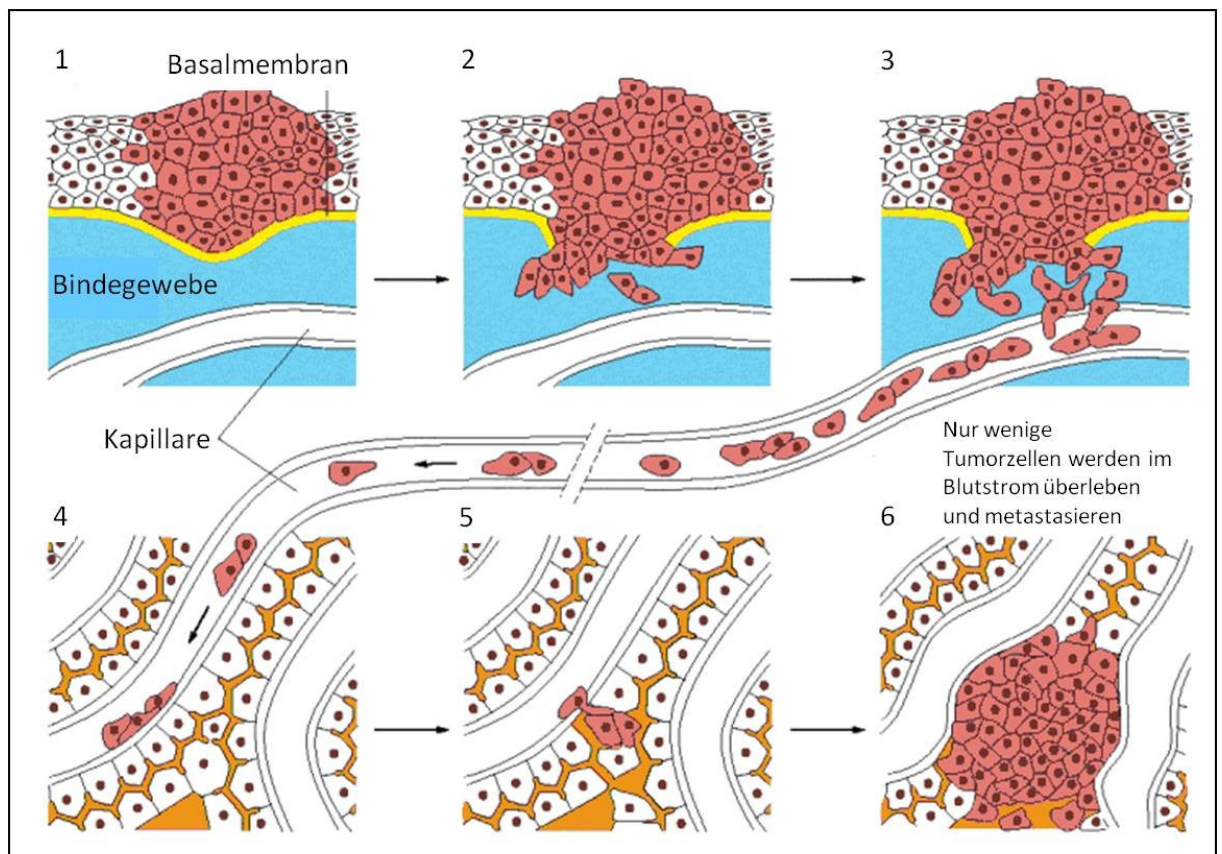


Abb. 1.1.: Schritte der Tumormetastasierung. Die abnormen Zellen wachsen zunächst als präneoplastische Läsion im Epithel (1), durchbrechen dann die Basalmembran (2) und wandern aktiv in eine Kapillare ein (3). Mit dem Blut-/ Lymphstrom werden die Tumorzellen zu anderen Organen (z.B. Herz, Lunge, Leber) transportiert. Am Zielorgan arretieren sie an der inneren Wand einer Kapillare (4), verlassen sie aktiv (Extravasation) und invadieren ins angrenzende Wirtsgewebe (5). Schließlich proliferieren die Tumorzellen und bilden so eine Metastase (6) (modifiziert nach: Lodish *et al.*, 2000).

1.3 Tiam1

Für die Tumorprogression und Metastasierung müssen die Tumorzellen zur Migration und Invasion befähigt sein (Engers & Gabbert, 2000). Dabei spielt der Tiam/Rac-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Regulation des biologischen Verhaltens maligner Tumore (Engers *et al.*, 2001; Habets *et al.*, 1994; Hordijk *et al.*, 1997; Keely *et al.*, 1997; Michiels *et al.*, 1995; Sander *et al.*, 1998). Allerdings ist bisher noch wenig über die molekularen Mechanismen, die zu einer Aktivierung von Tiam1 führen, bekannt.

Das Akronym Tiam1 steht für „*T-lymphoma invasion and metastasis gene 1*“. Humanes Tiam1 ist auf Chromosom 21q22 lokalisiert (Chen & Antonarakis, 1995). Es wird in Normalgewebe verstärkt im Gehirn und im Testis exprimiert. Heute weiß man außerdem, dass Tiam1 auch in verschiedenen humanen Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs exprimiert wird (Habets *et al.*, 1994; Minard *et al.*, 2004).

1994 konnte von der Arbeitsgruppe um J. Collard gezeigt werden, dass die N-terminale Verkürzung von Tiam1 die Invasion und Metastasierung in einer murinen T-Lymphomzelllinie induziert (Habets *et al.*, 1994). Das menschliche Homolog zum murinen Tiam1 zeigt eine Aminosäure-Sequenzübereinstimmung von ca. 90 % und wurde ein Jahr später von derselben Arbeitsgruppe identifiziert (Habets *et al.*, 1995; Mertens *et al.*, 2003; Chen & Antonarakis, 1995). Tiam1 gehört zur Dbl-Familie der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (engl. *guanine nucleotide exchange factors*; GEF) für Rho-ähnliche GTPasen und reguliert spezifisch die kleine GTPase Rac. Die GTPasen Rac, Rho und Cdc42 gehören zur Rho-Familie, die eine Untergruppe der Ras-Familie darstellt.

Die Proteine der Rho-Familie regulieren wichtige zelluläre Prozesse wie die Zellmigration, Apoptose, zelluläre Adhäsion, Zell-Zyklus-Progression, Genexpression und maligne Transformation (Malliri *et al.*, 2008). GTPasen sind inaktiv, solange sie an GDP gebunden sind und aktiv, wenn sie an GTP gebunden sind. Als GEF katalysiert Tiam1 diesen GDP-GTP-

Austausch spezifisch für Rac und wirkt so als eine Art molekularer Schalter zwischen inaktivem und aktivem Zustand von Rac. Mutationen oder eine fehlerhafte Regulation dieser Proteine kann den malignen Phänotyp in menschlichen Tumoren hervorrufen (Minard *et al.*, 2004).

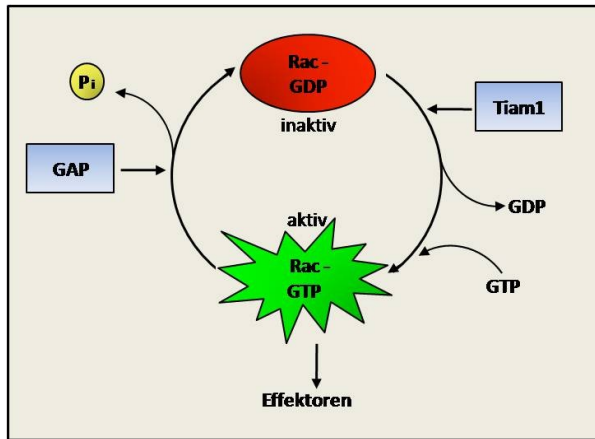


Abb. 1.2: Regulation der kleinen GTPase Rac durch Tiam1. Im GDP-gebundene Zustand ist Rac inaktiv. Tiam1 katalysiert als Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (GEF) den Austausch von GDP, so dass nun freies GTP an Rac binden kann. Im GTP-gebundenen Zustand ist Rac aktiv und es erfolgt eine Signalweiterleitung durch die Interaktion mit verschiedenen Effektoren. Rac inaktiviert sich durch die Hydrolyse eines Phosphatrests (Pi). Durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) kann dieser Vorgang beschleunigt werden.

Als spezifischer Aktivator der kleinen Rho-ähnlichen GTPase Rac schreibt man Tiam1 also eine entscheidende Rolle in der Regulation von maligner Transformation, Tumorprogression und Metastasierung zu.

1.3.1 Struktur von Tiam1

Das *Tiam1*-Gen codiert ein Polypeptid von 1591 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von ca. 177 kDa. Das Tiam1-Protein wird durch verschiedene funktionelle Domänen charakterisiert (Abb. 1.3).

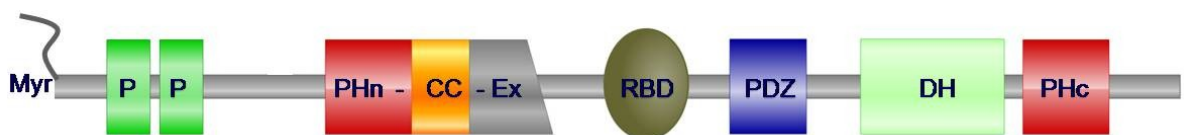


Abb. 1.3: Schematischer Aufbau der Tiam1-Domänenstruktur. Myr: Myristoylierungsstelle, P: PEST-Domäne, PHn: NH₂-terminale Pleckstrin-homologe-Domäne, CC: Coiled-Coil-Region, Ex: extended structure, RBD: Ras-Binde-Domäne, PDZ: PSD-95/DglA/ZO-1-Domäne, DH: Dbl-homologe Domäne, PHc: COOH-terminale Pleckstrin-Homologe-Domäne (aus: Hoffmann & Engers, 2008).

Am N-Terminus des Proteins weist ein Glycin-Rest an Position zwei auf eine potentielle Myristoylierungsstelle hin, die dazu dient das Protein an der Membran zu stabilisieren (Habets *et al.*, 1994, Mertens *et al.*, 2003). Tiam1 hat, wie andere GEFs auch, zwei aufeinanderfolgende PEST-Domänen (Prolin (P), Glutamin (E), Serin (S), Threonin(T)-reiche

Sequenz), die generell für den Abbau von Proteinen verantwortlich sind. Die Deletion dieser Domäne durch N-terminale Verkürzung stabilisiert das Protein und steigert somit seine Aktivität (Mertens *et al.*, 2003). Weiterhin besitzt Tiam1 zwei Pleckstrin-homologe (PH-) Domänen. Durch ihre direkte Nachbarschaft zu jeweils anderen Domänen haben sie jedoch unterschiedliche Funktionen in Tiam1. Der N-terminalen PH-Domäne (PHn) folgt eine sog. Coiled-coil (CC)-Region und eine daran anschließende Extended (Ex)-Sequenz. Bei letzterer handelt es sich aber nicht um eine Domäne im eigentlichen Sinne, sondern vielmehr um einen Abschnitt des Tiam1-Proteins, der zusammen mit PHn-CC eine funktionelle Einheit darstellt. Die gesamte Region wird kurz als PHn-CC-Ex bezeichnet und ist notwendig für die Lokalisation von Tiam1 an der Plasmamembran (Stam *et al.*, 1997, Mertens *et al.*, 2003). Diese Membranassoziation von Tiam1 ist weiterhin für das Tiam1-induzierte Rac-vermittelte *membrane ruffling* und die Aktivierung der cJun NH₂-terminalen Kinase (cJNK) erforderlich (Michiels *et al.*, 1997). Neben der N-terminalen PH-Domäne existiert eine zweite, C-terminal lokalisierte PH-Domäne (PHc). Diese ist neben einer Dbl-homologen (DH-) Domäne lokalisiert. Dieses DH-PH-Domänenentandem ist charakteristisch für Dbl-homologe GEFs wie Tiam1 und katalysiert den Nukleotidaustausch der GTPase Rac (Mertens *et al.*, 2003; Minard *et al.*, 2004). Darüber hinaus identifizierten Lambert *et al.* (2002) eine Ras-bindende Domäne (RBD), die eine direkte Interaktion mit dem aktiven Ras-Protein ermöglicht und nachfolgend zu einer Aktivierung von Rac führt. Schließlich besitzt Tiam1 auch eine PDZ-Domäne („*Postsynaptic density-96/Discs large/Zona occludens-1*“). PDZ-Domänen finden sich typischerweise in einer Reihe von Gerüstproteinen, die die Grundlage für die Organisation von Proteinkomplexen an spezifischen subzellulären Kompartimenten bilden (Sheng & Sala, 2001).

1.3.2 Funktionelle Bedeutung von Tiam1

Im Gegensatz zur invasionssteigernden Funktion in murinen T-Lymphomzellen, führt eine Überexpression von Tiam1 in Ras-transformierten, epithelialen „Madin-Darby canine kidney“ (MDCK)-Zellen durch Stimulation der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion zu einer Invasionshemmung (Hordijk *et al.*, 1997). Darüber hinaus konnte am Beispiel humaner Nieren- und Kolonkarzinomzellen gezeigt werden, dass Tiam1 und Rac zu einer selektiven Hochregulation von TIMP-1, auf transkriptioneller Ebene, und TIMP-2, auf posttranskriptioneller Ebene führen (Engers *et al.*, 2001). Weiterhin ist es gelungen,

wesentliche Elemente der Signalkaskade, die durch den Tiam1/Rac-Signalweg zu einer selektiven Hochregulation von TIMP-1 führt, aufzuschlüsseln (Engers *et al.*, 2006). Dies ist in sofern interessant, als dass damit ein weiterer molekularer Mechanismus der Invasionshemmung identifiziert wurde, der unabhängig von der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion existiert (Engers *et al.*, 2001). Die o. g. gegensätzlichen Beobachtungen in Bezug auf die Migration und Invasion weisen darauf hin, dass die durch Tiam1 induzierten Effekte vom Zelltyp, dem Zellsubstrat und der Möglichkeit abhängen, unter den jeweiligen Versuchsbedingungen E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion etablieren zu können (Sander *et al.*, 1998).

Neben dieser zentralen Funktion von Tiam1 in Bezug auf die Tumordinvasion und Metastasierung, ist der Tiam1/Rac-Signalweg auch entscheidend an der Entstehung von Tumoren beteiligt. So konnte an entsprechenden Mausmodellen gezeigt werden, dass Tiam1 zum einen für die Entstehung (Initiation und Promotion) Ras-induzierter Hauttumore (Papillome) benötigt wird (Malliri *et al.*, 2002). Zum anderen ist Tiam1 ein wichtiges Zielgen des (Wnt)-Signalwegs und spielt damit auch eine Rolle bei der Entstehung intestinaler bzw. kolorektaler Karzinome (Malliri *et al.*, 2006). Während der Tumordinitiation haben Tiam1, Rac und Ras zudem einen stimulierenden Einfluss auf die Zellproliferation und das Überleben der Zellen (Malliri *et al.*, 2003).

Tiam1 wird außerdem von mehr als 95 % aller humanen Prostatakzinome - im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe – signifikant überexprimiert. Diese Überexpression ist bereits auf der Stufe der präneoplastischen "*high grade*" prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (HG-PIN) nachweisbar (Engers *et al.*, 2006). Überdies konnten am Beispiel humaner Nierenzellkarzinome erstmals Tiam1-Mutationen in menschlichen Tumoren detektiert werden. Für eine dieser Mutationen (A441G) wurde bereits eine onkogene Funktion nachgewiesen. Diese Punktmutation reicht aus, um NIH/3T3-Zellen zu transformieren und interessanterweise ist diese Mutation in der funktionell sehr wichtigen PHn-CC-Ex-Region lokalisiert (Engers *et al.*, 2000).

Obwohl Tiam1 und Rac bei der Regulation zahlreicher wichtiger biologischer Funktionen maligner Tumoren eine besondere Rolle zugeschrieben wird, ist bis heute nur wenig über die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen bekannt. Da N-terminale Verkürzung des Proteins seine Aktivität steigert (Habets *et al.*, 1994), wäre eine Regulation durch Protein-Protein-Interaktionen am N-Terminus denkbar. Dies wurde auch bereits am Beispiel des

Tumorsuppressorgens nm23-H1 und für den Transkriptionsfaktor c-Myc gezeigt (Otsuki *et al.*, 2000; Otsuki *et al.*, 2002). Tiam1 ist ein spezifischer Aktivator der kleinen Rho-ähnlichen GTPase Rac und nach bisherigem Kenntnisstand werden alle o. g. zellbiologischen Funktionen auch durch Rac vermittelt (Michiels *et al.*, 1995; Strumane *et al.*, 2005). Zwar aktiviert Tiam1 alle drei Isoformen von Rac (Rac1, 2 und 3) und jede dieser Isoformen ist in der Lage, die Aktivität verschiedener Signalwege zu beeinflussen, aber Untersuchungen zur funktionellen Relevanz des Tiam1/Rac-Signalwegs beziehen sich praktisch alle auf Rac1 (Haeusler *et al.*, 2003). Dabei ergibt sich aber die Frage, wie es möglich ist, dass Tiam1 über die Aktivierung von Rac verschiedenste zellbiologische Funktionen reguliert, deren Effekte in Abhängigkeit der eingesetzten Versuchsbedingungen äußerst widersprüchlich sind.

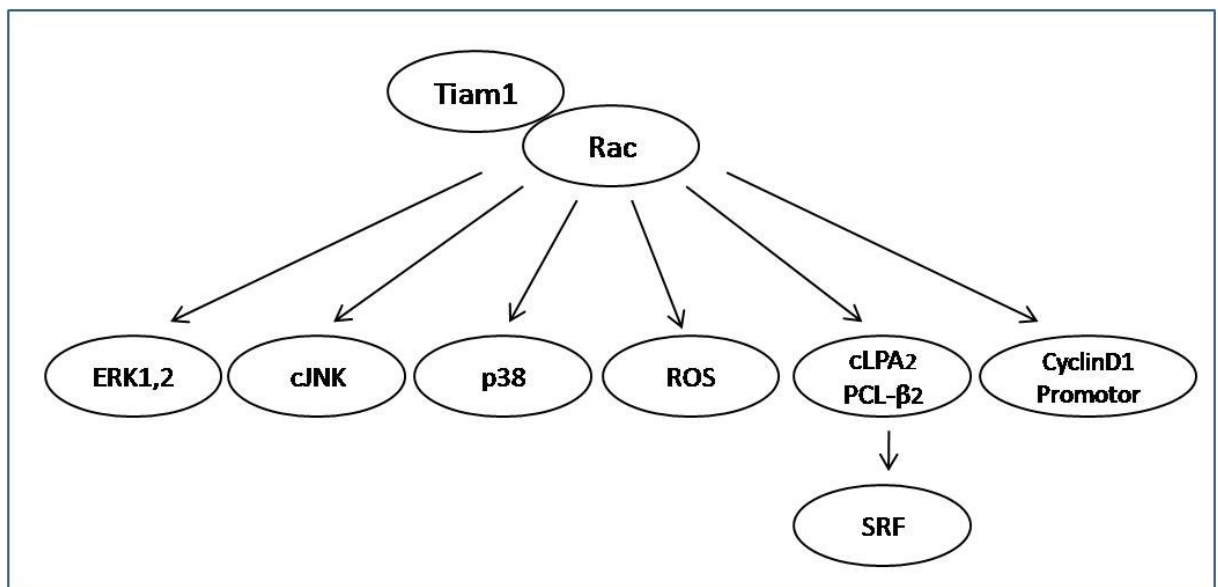


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Signalwege unterhalb von Tiam1/Rac. Insgesamt existieren mindestens sechs voneinander unabhängige Signalwege unterhalb von Rac. Diese führen in Abhängigkeit verschiedener Stimuli zur Aktivierung von ERK1, 2, der c-Jun-Kinase, des p38-Signalwegs und der Bildung reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS). Außerdem führt die Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2) bzw. der Phospholipase C-β2 (PLC-β2) zur nachfolgenden Aktivierung des SRF (*Serum response factors*). Ein weiterer Signalweg aktiviert den CyclinD1-Promotor.

Bislang existieren mindestens sechs voneinander unabhängige Signalwege, die sich auf der Ebene von Rac verzweigen (Abb. 1.4). Hierfür sind verschiedene Proteinabschnitte bzw. Aminosäuren in Rac verantwortlich (Engers *et al.*, 2006; Frost *et al.*, 1996; 1997; Kheramand *et al.*, 1998; Sulciner *et al.*, 1996; Westwick *et al.*, 1997; Woo *et al.*, 2000). Es ist jedoch nur wenig darüber bekannt, unter welchen Bedingungen diese Signalwege aktiviert werden und welche funktionellen Konsequenzen sich daraus für verschiedene Tumorentitäten ergeben.

Vermutlich beeinflusst Tiam1 jedoch durch die spezifische Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern die Affinität von Rac für bestimmte Effektorproteine.

1.3.3 Regulation und Aktivierung von Tiam1

Obwohl Tiam1 eine wichtige regulatorische Rolle für das biologische Verhalten von Tumoren spielt, ist bislang nur wenig darüber bekannt, wie die Aktivität von Tiam1 reguliert und die Selektivität der nachgeschalteten Rac-vermittelten Signalweitergabe bestimmt wird.

1.3.3.1 Regulation durch Phosphoinositolbindung

Western Blot Analysen und Immunfärbungen zeigten, dass Tiam1 vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist. Im Rahmen seiner Aktivierung ist jedoch eine Translokation an die Plasmamembran erforderlich. Ohne diese Translokation kommt es weder zu einer Aktivierung der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) noch zu Rac-induziertem *membrane ruffling* (Michiels *et al.*, 1997). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die PHn-CC-Ex- Region für die Membrantranslokation von Tiam1 verantwortlich ist (Stam *et al.*, 1997). Interessanterweise wurde am Beispiel humaner Nierenzellkarzinome (engl. Renal cell Carcinoma, RCC) erstmals eine in der PHn-CC-Ex-Domäne lokalisierte Punktmutation identifiziert, die zur Transformation benigner Zellen ausreicht (Engers *et al.*, 2000). Für die Membrantranslokation von Tiam1 spielt auch die Interaktion mit Phosphoinositolen eine wichtige Rolle. Diese binden an die PH-Domäne und fördern so die Translokation von Tiam1 an die Zellmembran (Minard *et al.*, 2004). Durch diese Membranassoziation wird die katalytische DH-PHc-Region von Tiam1 in direkte Nachbarschaft zu membrangebundenen Phospholipiden gebracht, was zu einer Beschleunigung des Nukleotidaustausches für Rac *in vitro* führt (Mertens *et al.*, 2003). Obwohl die PHc-Domäne schwächer mit Lipiden interagiert als die PHn-Domäne, hat die Lipidbindung an die PHc-Domäne einen direkten Effekt auf die katalytische Aktivität der benachbarten DH-Domäne (Fleming *et al.*, 2000; Crompton *et al.*, 2000). Inhibiert man durch gezielte Mutagenese die Fähigkeit der PHc- Domäne, Phosphoinositide zu binden, so ist Tiam1 in lebenden Zellen nicht weiter in der Lage, Rac zu aktivieren (Baumeister *et al.*, 2003). Dies deutet darauf hin, dass das katalytisch aktive DH-PHc-Tandem in Tiam1 für die effiziente Rac-Aktivierung noch gewisse Adaptermoleküle benötigt (Mertens *et al.*, 2003). Mit zwei PH-Domänen ist Tiam1 eher eine Ausnahme in der Dbl-Familie der GEFs, und verschiedene Experimente zeigen, dass das Protein beide Domänen gleichermaßen braucht. Aufgrund dessen lässt sich auch annehmen, dass zwei PH-

Domänen innerhalb desselben Proteins verschiedene Affinitäten für unterschiedliche Lipide haben. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die Zelltyp-spezifischen Funktionen von Tiam1 liefern (Minard *et al.*, 2004).

1.3.3.2 **Phosphorylierung von Tiam1**

Die Aktivierung von Tiam1 wird vermutlich auch durch Phosphorylierung beeinflusst. Studien zeigen, dass eine Assoziation von Tiam1 mit der Plasmamembran für die schnelle (De-) Phosphorylierung vorteilhaft für die Aktivierung des Proteins ist. So wurde für Tiam1 eine schnelle und anhaltende Threonin-Phosphorylierung in Swiss 3T3-Zellen durch die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Kinase II (CaMK-II) und die Protein Kinase C (PKC) beschrieben, nachdem die Zellen *in vivo* mit Lysophosphatidic Acid (LPA), einer wichtigen Komponente des Serums, und PDGF behandelt wurden (Mertens *et al.*, 2003; Fleming *et al.*, 1997). Umgekehrt wird durch die Inhibition von PKC teilweise die LPA-induzierte Phosphorylierung von Tiam1 blockiert (Fleming *et al.*, 1997). Insgesamt werden eine Reihe wichtiger Signalwege durch LPA reguliert, wie z.B. die Aktivierung von Ras und damit des Raf/MAPK-Signalwegs (Fleming *et al.*, 1997). LPA und PDGF induzieren die für eine Aktivierung des Proteins notwendige Translokation von Tiam1 an die Plasmamembran, und auch CaMK-II ist an der Translokation beteiligt. Wird die Phosphorylierung von Tiam1 durch CaMK-II nach LPA Behandlung ausgelöst, so wird dadurch die Nukleotidaustauschaktivität von Tiam1 gegenüber GST-Rac1 stimuliert (Minard *et al.*, 2004). Auch erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen steigern die intrinsische GEF-Aktivität von Tiam1 (Fleming *et al.*, 1998). Die übergeordneten Signale der Tiam1-induzierten Rac-Aktivierung sind bisher jedoch nicht abschließend charakterisiert.

1.3.3.3 **Protein-Protein-Interaktion**

Tiam1 bindet in Abhängigkeit verschiedener extrazellulärer Stimuli spezifisch an mehrere cytoplasmatische und Membran-assoziierte Proteine (Abb. 1.5).

Auf diese Weise wird nicht nur die Aktivität von Tiam1 als GEF und damit die Aktivität von Rac reguliert, sondern auch die Selektivität der Signalwege unterhalb von Rac determiniert (Mertens *et al.*, 2003). In Bezug auf die Krebsentstehung ist interessant, dass Tiam1 durch seine RBD direkt mit dem Membran-gebundenen, aktiven Ras-Proto-Onkogen interagieren kann und dass diese Interaktion die Tiam1-induzierte Aktivierung von Rac in Zellen stimuliert (Lambert *et al.*, 2002). Obwohl Ras in der Lage ist, Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-

K) zu aktivieren und auch Tiam1 prinzipiell durch PI3-K aktiviert werden kann (Fleming *et al.*, 2000), erfolgt die Ras induzierte, Tiam1-vermittelte Aktivierung von Rac jedoch unabhängig von PI3-K (Lambert *et al.*, 2002). Ein weiteres Protein, das an Tiam1 bindet, ist das Metastasierungs-Supressor-Gen Nm23H1. Nm23H1 bindet an den N-Terminus von Tiam1 im Bereich der N-terminalen 392 Aminosäuren (Otsuki *et al.*, 2000). Durch die Co-Expression von Nm23H1 und Tiam1 wird die Aktivität von Rac inhibiert. Die Bindung von Nm23H1 an Tiam1 verursacht vermutlich eine Konformationsänderung in Tiam1 oder eine Änderung seiner intrazellulären Lokalisation, so dass seine Funktion als GEF inhibiert wird (Otsuki *et al.*, 2000). Zusätzlich hemmt Nm23H1 die Tiam1-/Rac-induzierte JNK-Aktivität und das *membrane ruffling* (Minard *et al.*, 2004; Otsuki *et al.*, 2000). Weitere Proteine, die an Tiam1 binden, sind die Proteine JIP2/IB2, ein Gerüstprotein für p38 MAPK, und Spinophilin. Beide Bindungspartner von Tiam1 wurden durch ein Zwei-Hybrid-System in Hefen (engl. *Yeast Two-Hybrid-Screen*; Y2H) identifiziert und binden an die PHn-CC-Ex-Domäne. Durch die Assoziation von Tiam1 mit JIP/IB2 wird nicht nur die Bindung des Gerüstproteins an die Komponenten der p38-Signalkaskade beeinflusst, sondern es kommt auch zu einer Rac-vermittelten Stimulation der p38-Signalkaskade (Buchsbaum *et al.*, 2002). Die Interaktion zwischen Tiam1 und Spinophilin hingegen stimuliert die Aktivierung der p70 S6-Kinase (Buchsbaum *et al.*, 2003), welche nachfolgend die CyclinD1-Expression reguliert (Koziczak *et al.*, 2004).

Zur Identifikation weiterer potentieller Bindungspartner und damit potentieller Regulatoren von Tiam1, wurde in Voruntersuchungen zu dieser Arbeit ein Y2H mit einer humanen cDNA-Bank der Niere durchgeführt. Dabei wurde gezielt nach Bindungspartnern gesucht, die an den N-Terminus und/oder die PHn-CC-Ex-Domäne binden. Dazu wurden die N-terminalen 853 Aminosäuren von Tiam1 als Köderprotein („*bait*“) eingesetzt. Als spezifische und besonders interessante Bindungspartner für Tiam1 konnten so u. a. das Adaptor-Protein Vinexin- β und das Galactosid-bindende Lectin Galectin-1 identifiziert werden (Engers *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse).

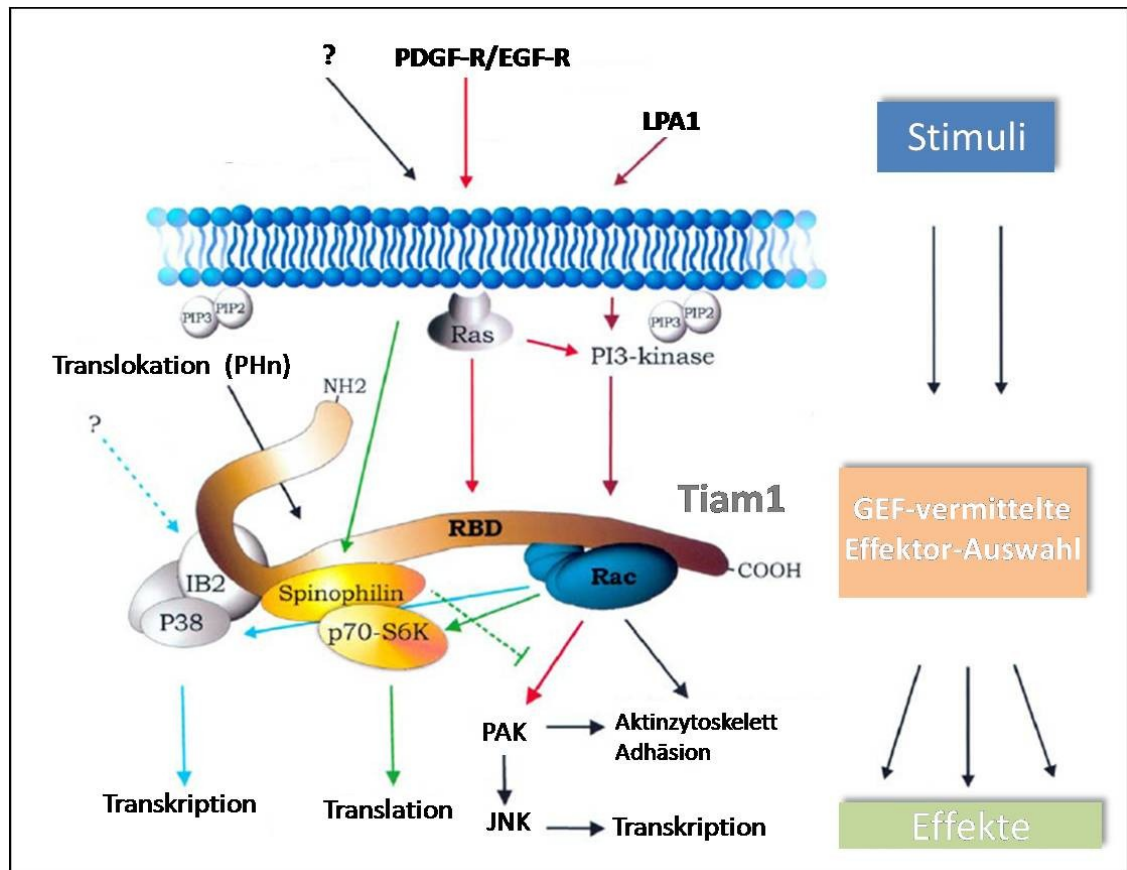


Abb. 1.5: Tiam1-vermittelte Signalweitergabe. Durch die spezifische Interaktion von Tiam1 mit anderen Proteinen wird die Selektivität der nachgeschalteten Rac-vermittelten Signalweitergabe determiniert (modifiziert nach: Mertens *et al.*, 2003).

1.4 Die Vinexin-Familie

Die Vinexin-Familie besteht aus einer Reihe von Adapter-Proteinen, die in Invertebraten und Vertebraten, jedoch nicht in Einzellern oder Pflanzen vorkommen (Kioka *et al.*, 2002). Neben Vinexin- α , Vinexin- β und Vinexin- γ zählen auch CAP (*c-Cbl associated protein*) /ponsin und ArgBP2 (*Arg-binding protein 2*) zu dieser Gruppe von Adapter-Proteinen. Jedes der o. g. Proteine ist im Besitz von drei SH3- (Src-homologen) Domänen, die sich am C-Terminus des Proteins befinden. SH3-Domänen sind häufig vorkommende Sequenzmotive in eukaryotischen Signaltransduktions- und Cytoskelett-Proteinen (Bar-Sagi *et al.*, 1993). Sie sind ca. 50-70 Aminosäuren lang und erkennen Prolin-reiche Sequenzen mit dem Konsensusmotiv PXXP (P = Prolin, X = beliebige AS) (Kioka *et al.*, 2002). Interessanterweise besitzen auch die Mitglieder der Vinexin-Familie selbst Prolin-reiche Sequenzen, mit deren Hilfe sie mit den SH3-Domänen anderer Proteine interagieren können. Sie fungieren also als SH3-Domänen-vermittelnde Adapter bzw. als Gerüst-Moleküle (Kioka *et al.*, 2002). Außer

Vinexin- β besitzen alle bisher identifizierten Mitglieder dieser Familie eine zusätzliche N-terminale SoHo- (Sorbin-Homologen) Domäne. Die Funktion dieser Domäne ist bislang nicht abschließend geklärt. Allerdings interagiert die SoHo-Domäne in CAP/ponsin und Vinexin- α spezifisch mit dem Membranprotein Flotillin, das in Cholesterin-reichen Mikrodomänen in Zellmembranen, den sog. Lipid Rafts, vorkommt (Kimura *et al.*, 2001, Thomas *et al.*, 2004). Vermutlich tragen Proteine mit einer SoHo-Domäne dazu bei, Cytoskelett- und Signalproteine in diese wichtige Mikrodomäne der Plasmamembran zu lenken. Während Vinexin- α und Vinexin- γ vornehmlich in der Skelettmuskulatur bzw. den Gonaden exprimiert werden, werden Vinexin- β , CAP/ponsin und ArgBP2 ubiquitär und dabei besonders stark im Herzen exprimiert (Kioka *et al.*, 2002, Matsuyama *et al.*, 2005). Da die Proteine dieser Familie keine katalytischen Domänen und somit keinerlei enzymatische Aktivität besitzen, sind sie hauptsächlich an der Regulation und Organisation des Cytoskeletts sowie der zellulären Signaltransduktion beteiligt (Kioka *et al.*, 2002).

1.4.1 Vinexin- β

Vinexin- β wurde 1999 von Kioka *et al.* als Vinculin-bindendes Protein isoliert und ist mit 329 AS die kleinste der drei bekannten Vinexin-Isoformen. Das komplette Vinexin-Gen besteht aus insgesamt 22 Exons, die auf Chromosom 8 lokalisiert sind (Kioka *et al.*, 1999). Aufgrund der fehlenden enzymatischen Aktivität der Vinexin-Isoformen ist die Funktion von Vinexin- β hauptsächlich darauf beschränkt, als Adapterprotein andere Proteine im Bereich von Zell-Zell-Kontakten und des Cytoskeletts miteinander zu verlinken. Im Gegensatz zu den beiden anderen Vinexin-Isoformen wird Vinexin- β , wie Vinculin auch, ubiquitär exprimiert. Besonders stark kommt es dabei in Herz- und Skelettmuskulatur vor, wo es sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert ist (Kioka *et al.*, 1999).



Abb. 1.6: Schematischer Aufbau der Vinexin- β -Domänenstruktur. Vinexin- β besitzt drei SH3-Domänen, die sich aus jeweils 50-70 Aminosäuren zusammensetzen. Die AS-Sequenz der SH3-Domänen ist unterstrichen. Die roten Pfeile weisen auf das PXXP-Motive hin, die als Erkennungsmotiv für SH3-Domänen anderer Proteine dienen (modifiziert nach Kioka *et al.*, 1999).

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Interaktion von Tiam1 mit Vinexin- β untersucht wurde, beschränken sich alle weiteren Beschreibungen auf diese Isoform.

1.4.2 Funktionelle Bedeutung von Vinexin- β

1.4.2.1 Rolle in der Signaltransduktion

Vinexin- β bindet über seine dritte SH3-Domäne an das GEF-Protein Sos, das GDP/GTP-Austausch für Ras und Rac katalysiert und somit eine ganz ähnliche Funktion erfüllt wie Tiam1 (Akamatsu *et al.*, 1999; Nimnual *et al.*, 1998). Interessanterweise bindet Vinexin- β dabei jedoch nur an inaktives bzw. nicht phosphoryliertes Sos und dissoziiert, sobald die Zellen mit Serum oder Wachstumsfaktoren wie EGF oder PDGF stimuliert werden (Akamatsu *et al.*, 1999). Eine Überexpression von Vinexin- β führte in NIH/3T3-Zellen nach EGF-Stimulation selektiv zu einer gesteigerten JNK-Aktivität, hatte aber keinerlei Effekt auf die durch Sos vermittelte ERK 1, 2-Signalkaskade (Akamatsu *et al.*, 1999). Weiterhin wird vermutet, dass Vinexin- β Sos zu den sog. fokalen Kontakten (engl. *focal contacts*) rekrutiert und somit eine Interaktion mit weiteren Proteinen der Signaltransduktion ermöglicht (Akamatsu *et al.*, 1999).

Neben der JNK-Signalkaskade ist Vinexin- β auch noch an der Regulation von weiteren klassischen Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK), den durch extrazelluläre Signale regulierte Kinasen ERK1 und ERK2, beteiligt (Mitsushima *et al.*, 2004). ERK reguliert verschiedene zelluläre Prozesse, wie z. B. die Differenzierung, Proliferation, Zelladhäsion und –migration sowie die Transkription. Die aktiven Kinasen ERK1, 2 binden an eine Linker-Region zwischen der zweiten und dritten SH3-Domäne von Vinexin- β und bewirken in Gegenwart von EGF eine Phosphorylierung von Ser 189 in Vinexin- β (Suwa *et al.*, 2002; Mitsushima *et al.*, 2004). Vermutlich wird die Bindung an ERK1, 2 über eine potentielle DEF (*docking for ERK FXFP*)-Domäne innerhalb der Linker-Region vermittelt (Mitsushima *et al.*, 2004). Mizutani *et al.*, (2007) haben anhand von LNCaP-Zellen zeigen können, dass die durch ERK1, 2-vermittelte Phosphorylierung von Vinexin- β die Zellausbreitung (engl. *cell spreading*) und sogar die Migration der Zellen verhindern konnte. ERK wird in der Regel in adhärennten Zellen durch lösliche Wachstumsfaktoren aktiviert und obwohl Vinexin- β selbst durch ERK phosphoryliert wird, ermöglicht es in Anwesenheit von EGF eine Phosphorylierung von ERK2 in nicht-adhärennten Zellen. In adhärennten Zellen zeigte Vinexin- β allerdings keinen Effekt auf

die ERK2-Aktivierung (Suwa *et al.*, 2002). Vinexin- β besitzt in nicht-adhärenenten Zellen eine stimulierende Wirkung auf PAK (*p21-activated Kinase*), die normalerweise durch PKA (*cAMP-abhängige Protein Kinase*) inhibiert wird. Durch die Stimulation von Vinexin- β kann ERK2 durch PAK aktiviert werden (Suwa *et al.*, 2002). Allerdings hebt PKA die stimulierende Wirkung von Vinexin- β auf, so dass für nicht-adhärenente Zellen ein Model aufgestellt werden konnte, in dem Vinexin- β in einer Signalkaskade unterhalb von PKA aber oberhalb von PAK agiert und somit zu einer Phosphorylierung von ERK2 führt (Suwa *et al.*, 2002).

Eine weitere Funktion ergibt sich für Vinexin- β innerhalb der Signaltransduktion durch die Regulation des Transmembranrezeptors EGFR. Vinexin- β interagiert mit EGFR über seine erste und dritte SH3-Domäne und reguliert den Phosphorylierungszustand des Rezeptors, indem es seine Dephosphorylierung verhindert (Mitsushima *et al.*, 2006). Dies geschieht durch die Interaktion von Vinexin- β mit der E3 Ubiquitin Ligase c-Cbl, die über die dritte SH3-Domäne von Vinexin- β vermittelt wird. Vinexin- β rekrutiert c-Cbl an die Zellmembran und verhindert dadurch eine Anreicherung von c-Cbl im Cytoplasma der Zelle, was eine Phosphorylierung des Rezeptors ermöglicht (Mitsushima *et al.*, 2006).

1.4.2.2 **Rolle in der Regulation des Cytoskeletts**

Vinexin- β /Vinculin-Komplexe befinden sich im Bereich der fokalen Kontakte von NIH/3T3 Fibroblasten und auch in Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakten, wo sie die Organisation des Aktin-Cytoskeletts beeinflussen (Kioka *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2005). Insbesondere steigern sie dort die Zellausbreitung (Kioka *et al.*, 1999), ein Effekt der auch für Tiam1 und Rac beschrieben wurde (Hamelers *et al.*, 2005). Vinculin wird ubiquitär exprimiert und spielt für die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte u. a. durch seine Bindung an Talin und F-Aktin, eine wichtige Rolle sowohl bei der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-, als auch bei der Integrin-vermittelten Zell-Substrat-Adhäsion (Ezzell *et al.*, 1997). Mittels *in-vitro* Bindungsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Vinexin- β an eine Prolin-reiche Region von Vinculin über die erste und zweite SH3-Domäne von Vinexin- β vermittelt wird (Kioka *et al.*, 1999). Diese Interaktion mit Vinculin ist essentiell für die Lokalisation von Vinexin- β im Bereich von fokalen Adhäsionen (engl. *focal adhesions*) und adhärenenten Kontaktstellen (engl. *adherens junctions*) (Takahashi *et al.*, 2005). Hier steigert Vinexin- β die Bildung von Aktin-Stressfasern (engl. *actin-stress fibers*) und die Größe der fokalen Adhäsionen (Kioka *et al.*, 1999). Im Zusammenhang mit der Vinexin- β -Vinculin-Aktin-Interaktion ist zusätzlich ein

weiteres Protein von Bedeutung. Mit seiner C-terminalen, dritten SH3-Domäne interagiert Vinexin- β auch mit dem Membran-assoziierten Protein Ip-dlg (*large type of p-dlg*) (Wakabayashi *et al.*, 2003). Dieses Protein bildet zusammen mit Vinexin- β und β -Catenin einen Dreierkomplex im Bereich der Zell-Zell-Kontakte, so dass Vinexin- β möglicherweise ein wichtiges Bindeglied zwischen dem Cadherin/Catenin/Ip-dlg-Komplex und dem Aktin-Cytoskelett darstellt (Wakabayashi *et al.*, 2003).

Desweiteren bindet Vinexin- β mit seinen ersten beiden SH3-Domänen auch an die Prolinreiche Region des Proteins WAVE2 (*Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein*). Dieses Protein spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktinpolymerisation migrierender Zellen und ist außerdem ein Effektorprotein von Rac (Mitsushima *et al.*, 2006; Takenawa *et al.*, 2001). Indem es den Proteosomen-abhängigen Abbau von WAVE2 inhibiert, steigert Vinexin- β indirekt die Expression dieses Proteins. Auch hier agiert Vinexin- β in Abhängigkeit von PKA (Mitsushima *et al.*, 2006). Durch die Interaktion von WAVE2 und Vinexin- β wird WAVE2 außerdem in räumliche Nähe zur Kinase Abl gebracht. Diese bindet an die dritte SH3-Domäne von Vinexin- β und phosphoryliert WAVE2, wodurch die Mobilität von WAVE2 reduziert wird. Abl ist ein Regulator des Aktin-Cytoskeletts, insbesondere im Bereich sog. *membrane ruffles* (Mitsushima *et al.*, 2006). Auch in diesem Dreierkomplex ist Vinexin- β ein wichtiges Bindeglied, denn hier ist eine Regulation des Aktin-Cytoskeletts im Bereich der *membrane ruffles* denkbar.

Ein weiterer Interaktionspartner von Vinexin- β ist SHIP2 (*scr homology 2 (SH2) domain-containing inositol 5-phosphatase*). Die Interaktion mit Vinexin- β wird durch den C-Terminus von SHIP2 vermittelt, wobei das aktive Zentrum der Phosphatase seine Funktion behält. Der Vinexin- β /SHIP2-Komplex wird durch Vinexin- β an die Zellperipherie gebracht, wo er vermutlich die Zell-Zell-Adhäsion beeinflusst (Paternotte *et al.*, 2005). In wieweit diese Interaktion Einfluss auf die Organisation des Cytoskeletts hat, ist bislang jedoch nicht abschließend geklärt.

2009 hat die Arbeitsgruppe um Nagata *et al.* mit dem Rho-Effektor Protein Rhotekin einen weiteren interessanten Bindungspartner von Vinexin- β identifiziert. Die Bindung wird durch die dritte SH3-Domäne von Vinexin- β vermittelt und ist in der Nähe der fokalen Kontakte lokalisiert, wo der Komplex eine wichtige Rolle spielen könnte (Nagata *et al.*, 2009).

Aufgrund der homologen Funktionen der GEFs Tiam1 und Sos und der bislang bekannten Eigenschaften von Tiam1 und Vinexin- β , erscheint auch eine Interaktion von Tiam1 und Vinexin- β plausibel. Beide Proteine sind in die Regulation des Aktin-Cytoskeletts, der Zell-Zell-Adhäsion und der Zellausbreitung eingebunden. Außerdem führt sowohl die Überexpression von Tiam1 als auch von Vinexin- β zu einer Verstärkung der EGF-induzierten JNK-Aktivität.

1.5 Überblick über die Galectin-Familie

Die Familie der Galectine besteht aus einer Reihe strukturell ähnlicher Proteine, die sich durch ihre Affinität für β -Galactose-haltige Oligisaccharide (β -Galactoside) auszeichnet. Jedes der mittlerweile 15 in Säugern identifizierten Mitglieder besitzt mindestens eine Carbohydrat-Erkennungs-Domäne (engl. *Carbohydrate-Recognition-Domain*; CRD), die aus ca. 130 Aminosäuren besteht (Barondes *et al.*, 1994, Rabinovich, 2005). Während ein Teil der Galectin-Familie nur eine CRD besitzt und biologisch entweder als Monomer (Galectin-5, -7, -10) oder als Homodimer (Galectin-1, -2, -11, -13, -14,-15) aktiv ist, besitzt ein anderer Teil zwei CRDs, die durch eine kurze Linker-Region miteinander verbunden sind (Galectin-4, -6, -8, -9, -12) (Camby *et al.*, 2006). Galectin-3 ist ein chimäres Protein mit einer CRD und einer „Nicht-Lektin“-Domäne (Rabinovich *et al.*, 2005). Die CRDs aller Galectine haben eine hohe Sequenzhomologie und damit eine Affinität für den Liganden N-Acetyllactosamin, einem Disaccharid, das in vielen zellulären Glycoproteinen vorhanden ist (Camby *et al.*, 2006). Dabei können einige Mitglieder der Galectin-Familie zusätzlich verschiedene Modifikationen des Liganden erkennen, was auf eine hohe Spezifität der Galectine auf Gewebe- und Entwicklungs-spezifische Liganden hinweist (Ahmad *et al.*, 2004).

In der Literatur werden den Galectinen unterschiedliche Funktionen in diversen biologischen Prozessen zugeschrieben, da die Proteine sowohl in verschiedenen Zellkompartimenten vorkommen können als auch im extrazellulären Raum sekretiert werden (Hughes, 1999; Danguy *et al.*, 2002; Liu & Rabinovich, 2005). Das sind u. a. Prozesse, die die Regulation der Zell-Zell-Adhäsion, der Zell-Matrix-Adhäsion, der Proliferation, der Apoptose und der Immunantwort beeinflussen (Kopitz *et al.*, 1998). Aufgrund ihrer Expression in verschiedenen Tumorzelltypen schreibt man den Galectinen auch eine Rolle in der Tumorgenese und der Metastasierung zu. Vermutlich wirkt die Multivalenz einzelner

Galectine auf verschiedene Signaltransduktionswege, indem eine Aggregation spezifischer Zelloberflächen-Glykoproteinrezeptoren induziert wird (Rabinovich *et al.*, 2002a).

1.5.1 Galectin-1

Als erstes Mitglied der Galectin-Familie wurde Galectin-1 beschrieben, ein nicht-kovalent gebundenes Homodimer mit nur einer CRD. Galectin-1 wird in Geweben wie Skelett-Muskulatur, Leber, Lunge und Milz aber auch in verschiedenen Tumoren exprimiert (Rubinstein *et al.*, 2004). Die gewebespezifische Expression von Galectin-1 wird durch DNA-Methylierung kontrolliert (Salvatore *et al.*, 1998, Salvatore *et al.*, 2000, Gauthier *et al.*, 2008). Die biochemischen Merkmale von Galectin-1, wie der acetylierte N-Terminus, das Fehlen einer Signal-Sequenz für die Sekretion und die Erforderlichkeit einer reduzierenden Umgebung (Biron *et al.*, 2006), entsprechen denen eines cytoplasmatischen Proteins. Die Sezernierung von Galectin-1 erfolgt nicht an ER-gebundene, sondern an freien Ribosomen, und demzufolge nicht über den ER/Golgi-Signalweg sondern über einen eher „unklassischen“ und noch wenig verstandenen Mechanismus (Hughes *et al.*, 1999). Nickel *et al.* (2005) vermuten, dass Galectin-1, ähnlich wie FGF-2, über eine direkte Translokation entlang der Plasmamembran transportiert wird, was die Anwesenheit integraler Membranproteine und cytosolischer Faktoren erforderlich macht. Die zentrale Domäne für die Erkennung von Galectin-1 durch β -galactosidhaltige Oberflächenmoleküle ist vermutlich die CRD. Durch eine Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase konnte gezeigt werden, dass auch der Galectin-1- Export inhibiert wird; ein Hinweis darauf, dass die Ionenpumpe eine Rolle in der Galectin-1 Sekretion spielen könnte (Nickel *et al.*, 2005).

Galectin-1 liegt in Lösung als Dimer vor (Lopez- Lucendo *et al.*, 2004), wobei es in geringen Konzentrationen (ca. 1 μM) spontan in seine monomere Form dissoziiert (Cho and Cummings, 1995). Mit der extrazellulären Matrix (ECM) verschiedener normaler und neoplastischer Gewebe interagiert Galectin-1 über seine Oberflächen-Kohlenhydratreste. Wie die meisten Galectine verliert auch Galectin-1 seine extrazelluläre Aktivität in nicht-reduzierender Umgebung oder wenn ein entsprechender Kohlenhydrat-Ligand fehlt. Möglicherweise regulieren die Sekretion und die Affinität von Liganden die Aktivität und Stabilität des extrazellulären Galectin-1 (Camby *et al.*, 2006). Intrazellulär ist Galectin-1 hauptsächlich im Cytoplasma und Zellkern lokalisiert, kommt aber auch an der intrazellulären Seite der Zellmembran vor. Im Gegensatz zu den extrazellulären Gegebenheiten erfolgt die intrazelluläre Bindung von Galectin-1 an die jeweiligen

Bindungspartner jedoch Kohlenhydrat-unabhängig. Unter den Galectin-1-Bindungspartnern scheint es dabei interessanterweise weder vergleichbare Motive oder Domänen zu geben, noch strukturelle Homologien. Auch die jeweils bindungsrelevanten Galectin-1-Domänen wurden bislang noch nicht identifiziert (Camby *et al.*, 2006).

1.5.1.1 **Domänen-Struktur von Galectin-1**

Das humane Galectin-1-Gen (*LGALS1*; lectin, galactoside- binding, soluble) ist auf Chromosom 22q12 lokalisiert und das 0,6 kb Transkript codiert für ein 135 Aminosäuren großes Protein (Merhabian *et al.*, 1992, Camby *et al.*, 2006). Galectin-1 ist ein nicht-kovalent gebundenes Homodimer bestehend aus zwei Untereinheiten von je ca. 14,5 kDa. Der N- und der C-Terminus liegen sehr eng beieinander (Abb. 1.7) und stellen die Kontaktregion für die Selbstassoziation zweier Monomere zu einem Dimer dar (Scott & Zhang, 2002).

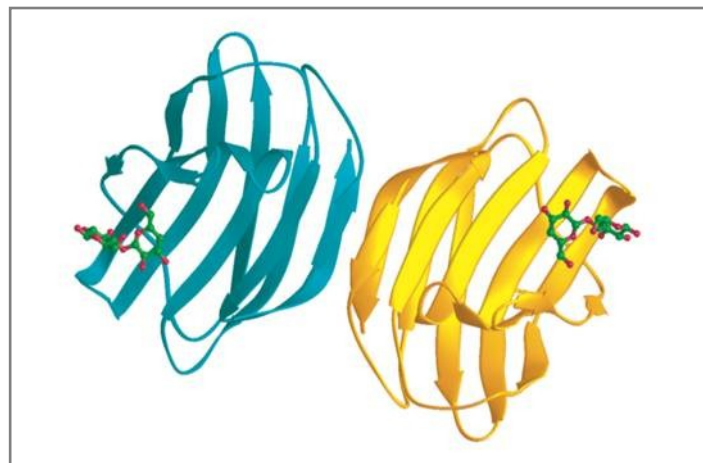


Abb. 1.7: Die β -Faltblatt-Struktur von Galectin-1. Bändermodell von Galectin-1 basierend auf Kristallstrukturanalyse. N- und C-Termini der Monomere (blau und gelb dargestellt) liegen sehr nah beieinander und sind die Kontaktregion für die Dimerbildung. Gegenüber dieser Kontaktregion liegen die CRDs. Die Bindung eines Lactosemoleküls (Gal β 1-4Glc) an die CRD wird innerhalb der Faltblattstruktur schematisch angezeigt (aus: Cummings und Liu, 2009).

Außer der CRD fanden Rotblat *et al.* (2004) eine weitere Domäne in Galectin-1. Sie identifizierten eine hydrophobe, potentielle Farnesyl-Bindungstasche analog der Cdc42-Geranylgeranyl-Bindedomäne von RhoGDI. Diese Tasche beinhaltet typische Isoprenoid-bindende Reste, an die die Farnesyl-Gruppe des Ras-Proteins binden könnte. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gefestigt, dass eine gerichtete Mutation in dieser Tasche (L11A-Substitutionsmutante) in einer vollständigen Umkehrung der Galectin-1-Funktion resultiert. Aus einem positiven H-Ras Regulator wird durch diese Mutation ein Protein, das H-

Ras in seiner Funktion stark beeinträchtigt. Ob die Galectin-1/H-Ras-Interaktion tatsächlich durch die Bindung der Farnesyl-Gruppe in die beschriebene Tasche erfolgt, ist bislang noch nicht abschließend geklärt (Rotblat *et al.*, 2004).

1.5.2 Funktionelle Bedeutung von Galectin-1

Galectin-1 gehört zur Familie der Galactosid-bindenden Lectine und wird – ähnlich wie Tiam1– mit biologischen Prozessen wie dem Zellwachstum, Entzündungsreaktionen, maligner Transformation, Differenzierung und Metastasierung in Verbindung gebracht (Itzkowitz *et al.*, 1997; Camby *et al.*, 2006). Eine Expression von Galectin-1 wurde bereits in verschiedenen Tumorarten beobachtet (Danguy *et al.*, 2002). Interessanterweise fand sich dabei mehrfach eine positive Korrelation der Galectin-1-Expression mit der Aggressivität von Tumoren und deren Potential zu metastasieren (Rabinovich, 2005). Bezüglich des Einflusses von Galectin-1 auf die Wachstumsprozesse von Zellen findet man jedoch oft widersprüchliche Untersuchungen. Während Galectin-1 keinen Einfluss auf das Wachstum von Kolonkarzinomzellen hat (Hittelet *et al.*, 2003), wirkt es wachstumshemmend auf Neuroblastome (Kopitz *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden aber auch wachstumsstimulierende und dosisabhängige antagonistische Effekte beobachtet. So führten geringe Dosen (ca. 1 ng) zu einer Proliferationssteigerung, während hohe Dosen von ca. 1 µg die Zellproliferation inhibierten (Adams *et al.*, 1996). Diese paradoxen Effekte sind abhängig von dem Zelltyp und Aktivierungsstatus von Galectin-1. Außerdem werden sie möglicherweise durch das Verhältnis von monomeren zu dimeren Formen bzw. extrazellulärem zu intrazellulärem Galectin-1 beeinflusst (Camby *et al.*, 2006). Extrazellulär bindet Galectin-1 an das Disaccharid N-Acetyllactosamin (LacNAc; Galβ1-4GlcAc). Bestimmte Glykoproteine wie z. B. die Matrixproteine Laminin und Fibronectin sind daher durch die vielen vorhandenen Polylaktosaminketten sehr gute Liganden für Galectin-1. Entsprechend wurde an unterschiedlichen Zelltypen gezeigt, dass extrazellulär vorkommendes Galectin-1 die Adhäsion dieser Zellen an verschiedene Matrixproteine wie Laminin oder Fibronectin steigert (Musacchoi *et al.*, 1992; van den Brule *et al.*, 1995; 2003). Am Beispiel von Melanomzellen konnte außerdem gezeigt werden, dass Galectin-1 sowie Galectin-3 zur Bildung vielzelliger Aggregate führen (Tinari *et al.*, 2001). Dies ist besonders interessant, da auch schon für Tiam1 vergleichbare Effekte in einer Nierenkarzinomzelllinie beobachtet werden konnten (Engers *et al.*, 2001). Hier könnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen Galectin-1 und Tiam1 bestehen.

Während die extrazellulären Galectin-1-Funktionen überwiegend von seiner Lectin- Aktivität abhängen, sind die meisten intrazellulären Funktionen hiervon unabhängig und werden eher durch Interaktionen mit anderen Proteinen bestimmt (Camby *et al.*, 2006). Intrazellulär ist Galectin-1 im Kern, im Cytoplasma und auch an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert (Camby *et al.*, 2006; Saussez *et al.*, 2006), so dass inzwischen mehrere Bindungspartner für Galectin-1 in verschiedenen Zellkompartimenten identifiziert werden konnten (Camby *et al.*, 2006). So konnte z. B. gezeigt werden, dass Galectin-1 mit onkogenem H-Ras interagiert und somit eine Schlüsselrolle in der Initiation Ras-induzierter Tumore spielt (Paz *et al.*, 2001). Diese Interaktion ist in sofern besonders interessant, weil Ras auch an Tiam1 bindet und Tiam1 für die onkogene Funktion von Ras benötigt wird (Lambert *et al.*, 2002; Malliri *et al.*, 2002). Ähnlich wie Tiam1, bindet auch Galectin-1 bevorzugt an aktives, d.h. GTP-gebundenes H-Ras bzw. konstitutiv aktives (d. h. onkogenes) H-Ras G12V (Paz *et al.*, 2001). Darüber hinaus steigert eine Überexpression von Galectin-1 die Membranassoziation von H-Ras, was nachfolgend über eine ERK- Aktivierung zur onkogenen Transformation von Zellen führt (Paz *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Galectin-1 die EGF-induzierte Ras-Aktivierung verlängert und die nachgeschaltete Signalkaskade selektiv über Raf-1 in Richtung ERK lenkt, während gleichzeitig die Ras-vermittelte Aktivierung der Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) gehemmt wird (Elad-Sfadia *et al.*, 2002).

In Analogie zur Interaktion mit Ras ist daher denkbar, dass Galectin-1 durch seine Bindung an Tiam1 Einfluss darauf nimmt, welche Signalwege unterhalb von Rac selektiv aktiviert werden. Zudem könnte der Aktivitätszustand von Ras eine Rolle dabei spielen, ob Galectin-1 und Tiam1 aneinander binden oder nicht bzw. könnte Galectin-1 die Bindung von Ras an Tiam1 beeinflussen und somit wesentliche Funktionen von Tiam1 und auch Ras regulieren.

2 Zielsetzung der Arbeit

Der Tiam/Rac-Signalweg spielt zum einen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung maligner Tumore, zum anderen kommt ihm auch eine wichtige Bedeutung bei der Regulation des Invasions-, Migrations- und Adhäsionsverhalten von Tumoren zu. Über die molekularen Mechanismen, die die Aktivität von Tiam1 regulieren und somit die Rac-vermittelte Signalweitergabe bestimmen, ist bisher jedoch nur wenig bekannt. Einige Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass die Aktivierung von Tiam1 auch über die spezifische Bindung an verschiedene Proteine reguliert werden könnte. Dabei dürften insbesondere der N-Terminus und/oder die funktionell wichtige PHn-CC-Ex-Domäne in diese Interaktionen involviert sein. Um neue potentielle Bindungspartner von Tiam1 zu identifizieren, die möglicherweise auch einen Einfluss auf die Signalwege unterhalb von Tiam1 und Rac haben, wurde im Vorfeld zu der vorliegenden Arbeit ein Y2H mit einer humanen cDNA-Bank der Niere durchgeführt. Um gezielt nach Interaktionspartnern zu suchen, die spezifisch an den N-Terminus und/oder die PHn-CC-Ex-Domäne binden, wurde dabei ein 2559 nt langes Tiam1-Fragment als Köder eingesetzt, das den N-terminalen 853 Aminosäuren entspricht und auch die PHn-CC-Ex-Domäne enthält.

Hierbei ist es gelungen mit Galectin-1 (Acc. nm_002305) und Vinexin- β (Acc. nm_005775) zwei besonders interessante Bindungspartner von Tiam1 zu identifizieren, die aufgrund ihrer bisher bekannten funktionellen Eigenschaften eine wichtige Rolle für die Aktivierung des Tiam/Rac-Signalwegs spielen könnten.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die in die verschiedenen Bindungen involvierten Domänen der Interaktionen zwischen Tiam1 und Vinexin- β bzw. Tiam1 und Galectin-1 identifiziert werden. Diese Untersuchungen wurden mittels Co-Immuno-Präzipitation und konfokaler Laserimmunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

Es ist denkbar, dass Tiam1 die Bindungsspezifität von Rac für seine Effektoren beeinflusst. Die Bedingungen, die zu einer spezifischen Aktivierung der einzelnen Signalwege führen, sind jedoch unklar. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Einfluss von Vinexin- β und Galectin-1 auf die Tiam1-induzierte Rac-Aktivierung sowie die Selektivität der nachgeschalteten Rac-vermittelten Signalwege untersucht.

Sowohl Tiam1 als auch Galectin-1 binden bevorzugt an aktives Ras (Paz *et al.*, 2001). Um nun zu untersuchen welche Auswirkungen, die Aktivierung von Ras auf die Interaktionen zwischen Tiam1 und Vinexin- β bzw. Tiam1 und Galectin-1 hat, wurde zuerst der Einfluss der Ras-Aktivierung auf die Bindungen zwischen Tiam1 und Vinexin- β bzw. Tiam1 und Galectin-1 untersucht. Desweiteren wurde umgekehrt der Einfluss von Vinexin- β und Galectin-1 auf die Bindung zwischen Tiam1 und aktivem Ras untersucht. Darüber hinaus bindet Vinexin- β an den Ras-Aktivator Sos und wird nach Stimulation mit EGF aus dieser Bindung freigesetzt (Akamatsu *et al.*, 1999). Daher sollte in diesem Zusammenhang auch der Einfluss von Tiam1 auf die EGF-induzierte Bindung zwischen Vinexin- β und Sos bzw. Vinexin- β und ERK 1,2 eruiert werden.

In Vorarbeiten zu der vorliegenden Dissertation konnte am Beispiel humaner Nieren- und Kolonkarzinomzellen gezeigt werden, dass Tiam1 und Rac zu einer signifikanten Hemmung der Invasion und Migration sowie zu einer gesteigerten Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion führen. Außerdem wurde mit der selektiven Hochregulation von TIMP-1 und TIMP-2 ein neuer molekularer Mechanismus entdeckt, über den Tiam1 und Rac die Invasivität hemmen. Im letzten Teil wurden daher Untersuchungen hinsichtlich der funktionellen Relevanz der Interaktionen zwischen Tiam1 und Vinexin- β bzw. Tiam1 und Galectin-1 im Hinblick auf die Regulation der Tumorinvasion, Migration, Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion vorgenommen.

3 Material

3.1 Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius AG (Göttingen, D)
Autoklav	Systec (Wettenberg, D)
Brutschrank	Heraeus (Hanau, D)
Durchflussscytometer	Partec (Görlitz, D)
Elektrophoresekammer	Roth (Karlsruhe, D)
Fastblot-Apparatur	Biometra (Göttingen, D)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen, D)
Inkubationsroller RM5	CAT Zipperer GmbH (Staufen, D)
Inkubationsschüttler 3033	GFL® (Burgwedel, D)
Inkubator	Memmert® (Schwabach, D)
Luminometer (MiniLumat LB 9506)	Berthold (Bundoorra, Vic, Australien)
Li-COR Odyssey Infrared Imager	Li-OR Biosciences GmbH (Bad Homburg, D)
Light Cycler (Real-Time-PCR-Gerät)	Roche Deutschland Holding GmbH (Grenzloch-Wyhlen, D)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph (Schwabach, D)
Mikroskop	Leitz / Leica (Wetzlar, D)
Mikroskop, konfokal	Zeiss (Göttingen, D)
Mikrowelle	AEG (Nürnberg, D)
Netzgeräte	BioRad (München, D)
Neubauer-Zählkammer	EC Apparatus Corporation
PCR- Gerät; GeneAmp PCR System 2400	Optik Labor (Friedrichsdorf, D)
pH-Meter; pH 211 Microprocessor	Perkin- Elmer® (Rodgau- Jügesheim, D)
Photometer	Hanna Instruments Deutschland GmbH (Kehl am Rhein, D)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
	Eppendorf (Hamburg, D)

Pipettierhilfen	Labsystems (Quickborn, D)
Sterilbank BSB4	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Thermomixer	Gelaire Flow Laboratories (Opera, Italien)
Tischautoklav	Eppendorf (Hamburg, D)
Ultraschallgerät Sonifier	Melag (Berlin, D)
Video Copy Prozessor	Bandelin electronics (Berlin, D)
Vortex Genie 2	Mitsubishi (Ratingen, D)
Wasserbad	Scientific Industries (Bohemia N.Y., USA)
Western Blot Anlage (vertikale Gelektrophorese)	GFL® (Burgwedel, D)
Zentrifugen: Labofuge 400R	Hoefer (San Francisco, USA),
Megafuge 1.0R	BioRad (München, D)
Mikro 22R	Heraeus Instruments (Hanau, D)
Universal 16R	Heraeus Sepatech (Osterode, D)
	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, D)
	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, D)

3.2 Verbrauchsmaterialien

12-, 24- und 96-well Mikrotiterplatten	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Amicon Ultra	Milipore (Bedford, USA)
Deckgläser	Menzel Gläser (Braunschweig, D)
FACS-Röhrchen	Sarstedt (Nürmbrecht, D)
Halbmikroküvette UVette	Eppendorf (Hamburg, D)
Hyperfilm ECL	Amersham Bioscience (Freiburg, D)
Kapillaren für Light Cycler	Biobudget Technologies GmbH (Krefeld, D)
Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH (Dassel, D)
Objektträger	Menzel Gläser (Braunschweig, D)
Parafilm	American National Can TM (Chicago, USA)
Pipettenspitzen	StarLab (Ahrensburg, D)
Plastikküvetten	Sarstedt (Nürmbrecht, D)
Plastikpipetten	Corning (New York, USA)

Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 und 2ml)	Sarstedt (Nürmbrecht, D)
	Eppendorf (Hamburg, D)
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Greiner (Frickenhausen, D)
Sterilfilter	Sartorius /vivascience AG (Hannover, D)
Whatman-Papier	Whatman GmbH (Dassel, D)
Zellkulturflaschen	Greiner (Frickenhausen, D)
Zellkulturschalen: Ø 3,4 cm	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Ø 6 cm	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Ø 10 cm	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellschaber	TPP (Trasadingen, Schweiz)

3.3 Chemikalien

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

3.4 Puffer und Lösungen

Lysepuffer nach Akamatsu (aus: Akamatsu <i>et al.</i> , 1999)	50 mM Tris-HCl; pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1% (v/v) Triton X-100 1 mM Na-Orthovanadat 100 mM NaF
<i>Annealing</i> -Puffer	100 mM NaCl 50 mM HEPES; pH 7.4
DEPC H ₂ O	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in dH ₂ O mind. 4 h bei RT rühren lassen und autoklavieren
Ethidiumbromid-Lösung	0,5 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O
Lysepuffer für phosphospezifische Antikörper	20 mM Tris-HCl; pH 7.5 0,27 M Sucrose

	1 mM EDTA	
	1 mM EGTA	
	1 mM Na-Orthovanadat	
	10 mM Na-β-Glycerophosphat	
	50 mM NaF	
	5 mM Na-Pyrophosphat	
	1 % (v/v) Triton X-100	
2 x HEBS-Puffer für $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Transfektionen	280 mM NaCl	
	10 mM KCl	
	1,5 mM Na_2HPO_4	
	12 mM Dextrose	
	50 mM HEPES	pH 7.05
Bakterien-Aufschluß-Puffer	20 % (w/v) Sucrose	
	10 % (v/v) Glycerol	
	50 mM Tris-HCl; pH 8,0	
	0,2 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	
	2 mM MgCl_2	
	2 mM DTT	
Co-IP-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl; pH 7.4	
	150 mM NaCl	
	0,2 % BSA	
	0,5 % Triton X-100	
<i>GST-Fish-Buffer</i> (aus: Sander <i>et al.</i> , 1998)	10 % (v/v) Glycerol	
	50 mM Tris-HCl; pH 7.4	
	100 mM NaCl	
	1 % (v/v) NP-40	
	2 mM MgCl_2	
RIPA-Puffer	50 mM Tris	
	150 mM NaCl	
	0,1 % (w/v) SDS	
	0,5 % Na-Deoxycholat	
	1 % TritonX-100	
2 x SDS Ladepuffer	10 % (v/v) Glycerol	
	2 % (w/v) SDS	
	125 mM Tris-HCL; pH 6.8	
	10 % (v/v) Mercaptoethanol	

	0,05 % (w/v) Bromphenolblau	
6 x SDS Ladepuffer	60 % (v/v) Glycerol 300 mM Tris-HCl; pH 6.8 12 mM EDTA 12 % (w/v) SDS 850 mM Mercaptoethanol 0,05 % (w/v) Bromphenolblau	
NP-40 Lysepuffer	5 mM EDTA 1 % (v/v) NP-40 0,5 % Na- desoxycholate 0,1 % (w/v) SDS 0,15 M NaCl 50 mM Tris-HCl; pH 7.5	
Stripping-Puffer	0,2 M Glycin 0,5 M NaCl	pH 2.8
PBS	80 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM NaH ₂ PO ₄ 0,1 M NaCl	pH 7.5
6 x DNA-Auftragspuffer	30 % (v/v) Glycerol 0,4 % (w/v) Orange G 10 mM Tris-HCl; pH 7.5 25 mM EDTA	
5 x TBE-Puffer	0,52 M Tris 0,51 M Borsäure 20 mM EDTA	
Transferpuffer	25 mM Tris 0,2 M Glycin 20 % (v/v) Methanol	
Waschpuffer/TBS- T	0,2 % (v/v) Tween20 0,01 M Tris-HCl; pH 7.5 0,15 M NaCl	
Trypsin-EDTA-Lösung	10 % (v/v) Trypsin	

	5 % (v/v) EDTA	in PBS
ECL-Lösung	<u>Lösung A:</u> 0,1 M Tris pH 8.6 2,5 mM Luminol in DMSO <u>Lösung B:</u> 6,7 mM p- Coumarinsäure in DMSO <u>Lösung C:</u> 3 % H ₂ O ₂	
Färbelösung für die Zymographie	30 % Methanol 10 % Eisessig 60 % H ₂ O 0,25 % Coomassie Blau	
Entfärbelösung für die Zymographie	30 % Methanol 10 % Eisessig 60 % H ₂ O	
Waschlösung für die Zymographie	2,5 % Triton X100	in H ₂ O
Reaktionspuffer für die Zymographie	0,05 M Tris-HCL; pH 7.5 0,02 M NaCl 5 mM CaCl ₂ 0,02 % Brij-35	

3.5 Protein- und Nukleinsäurestandards

3.5.1 DNA-Standards

1 kb-DNA-Leiter	Invitrogen (Paisley, Schottland)
100 bp-DNA-Leiter	Fermentas (St. Leon-Rot, D)

3.5.2 Proteinstandards

High Range Marker (Protein-Banden mit 200, 116, 97, 66, 45 kDa)	BioRad (München, D)
Low Range Marker (Protein-Banden mit 97, 66, 45, 31, 21, 14, kDa)	BioRad (München, D)

Prestained Protein Ladder Plus

Fermentas (St. Leon-Rot, D)

(Protein-Abschnitte mit 250, 130, 100, 72, 55, 35, 27, 15, 10 kDa)

3.6 Vektoren

pLZRS-IRES-neo	J. G. Collard (Amsterdam, NL)
pLZRS-IRES-zeo	J. G. Collard (Amsterdam, NL)
pMT2SM	J. G. Collard (Amsterdam, NL)
pRL-TK	W. Schulz (Düsseldorf, D)
pSuper	J. G. Collard (Amsterdam, NL)
pRetroSuper	J. G. Collard (Amsterdam, NL)
pA3LUC	J. G. Collard (Amsterdam, NL)
pGEX-4T3	A. Wittinghofer (Dortmund, D)
pcDNA3.1	Invitrogen (Paisley, Schottland)

3.7 Konstrukte

Myc- Vinexin-β -pMT2SM	S. Nockemann*→	transiente Transfektion
Myc- Vinexin-β -pLZRS-IRESneo	diese Arbeit*	} stabile Transfektion
Myc- Vinexin-β -pLZRS-IRESzeo	diese Arbeit*	
GST- Vinexin-β -pMT2SM	S. Nockemann*	} transiente Transfektionen
GST-pMT2SM	J. G. Collard, Amsterdam (NL)	
Myc-pMT2SM	J. G. Collard, Amsterdam (NL)	
sh-Vinexin-β -pRS	diese Arbeit*	} stabile Transfektion / <i>knockdown</i>
src-sh-Vinexin-β -pRS	diese Arbeit*	
Myc- Galectin-1 -pMT2SM	S. Nockemann*→	transiente Transfektion
Myc- Galectin-1 -pLZRS-IRESneo	diese Arbeit*	} stabile Transfektion
Myc- Galectin-1 -pLZRS-IRESzeo	diese Arbeit*	
Galectin-1(L11A) -pCDNA3	Y. Kloog, Tel Aviv (Israel) →	transiente Transfektion
sh-Galectin-1 -pRS	diese Arbeit*	} stabile Transfektion / <i>knockdown</i>
scr-sh-Galectin-1 -pRS	diese Arbeit*	

HA- FL-Tiam1 -pMT2SM	S. Nockemann*	}	transiente Transfektionen
HA- C1199-Tiam1 -pMT2SM	J. G. Collard, Amsterdam (NL)		
HA- 853-Tiam1 -pMT2SM	S. Nockemann*		
HA- C580-Tiam1 -pMT2SM	J. G. Collard, Amsterdam (NL)		
HA- N420-Tiam1 -pMT2SM	S. Nockemann*		
HA- PHn-CC-Ex-Tiam1 -pMT2SM	C. Collins*		
HA-pMT2SM	J. G. Collard, Amsterdam (NL)	}	Luciferase Assays
SREm -pA3LUC	J. G. Collard, Amsterdam (NL)		
Renilla -pRL-TK	W. Schulz, Düsseldorf		
GST- PAK -pGEX	J. G. Collard, Amsterdam (NL)	}	Herstellung rekombinanter Proteine für <i>PullDownAssays</i>
GST- PDB -pGEX-4T3 (AS 69-150)	J. G. Collard, Amsterdam (NL)		
GST- Raf-RBD -pGEX	A. Wittinghofer, Dortmund		

*die Konstrukte wurden in Vorarbeiten zu der vorliegen Arbeit durch die o.g. Personen / in der vorliegenden Arbeit generiert

3.8 Oligodesoxyribonukleotide

Alle folgenden Oligodesoxyribonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon(Ebersberg) im Auftrag synthetisiert.

3.8.1 Sequenzierungsprimer

pRSforward (1333-1355): 5'- CCCTGAACCTCCTCGTTCGACC- 3'

pRSseq (1697-1716): 5'- GCTGACGTCATCAACCCGCT-3'

pRSreverse (1953-1975): 5'- GAGACGTGCTACTTCCATTTGTC- 3'

T3-Primer: 5'- AATTAACCCCTCACTAAAGGG -3'

M13-5'-Primer: 5'- GGCGATTAAGTTGGGTA-3'

M13-3'-Primer: 5'- AGGCTTTACACTTTATG-3'

T7-Primer: 5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3'

3.8.2 Primer für qRT-PCR

GAPDH -qPCR fwd: 5'- AGGTGAAGGTCGGAGTCA -3'

GAPDH -qPCR rev: 5'- GGTCATTGATGGCAACAA -3'

Galectin-1 qPCR fwd: 5'- GAGAGTGCCTTCGAGTGCG -3'

Galectin-1 qPCR rev: 5'- AGTTGATGGCCTCCAGGTTG -3'

Vinexin-β qPCR fwd: 5'-AGGTGCTGGAGTATGGAGAG-3'

Vinexin-β qPCR rev: 5'-TCGTACCAGTTCTCGTTCACC-3'

3.8.3 Primer für die Klonierung in pLZRS-IRES neo/zeo

5'-myc-Galectin-1

5'- ATC**GATCC**ATGGAGCAGAAGCTGATCTCCGAGGAGGACCTGATGGCTTGTGGTCTGGTCGCC -3'

3'-myc-Galectin-1

5'- GACTCGA**CTCGAG**TCAGTCAAAGGCCACACATTTGATCTT -3'

5'-myc-Vinexin-β

5'- ATC**GATCC**ATGGAGCAGAAGCTGATCTCCGAGGAGGACCTGATGGCTGATGGAGGAAGCCCC -3'

3'-myc-Vinexin-β

5'- GACTCGA**CTCGAG**TCACACCGGGCAACGTAATTTCC -3'

(**rot**: eingefügte Restriktionsschnittstellen; **blau**: Myc-Tag-Sequenz)

3.8.4 Oligonukleotide für die sh-Expressionsvektoren

Zum *knockdown* von Vinexin-β aus *Homo sapiens*:

sh-sense-Vinexin-β

5'- **GATCC**ACCCAGAAATTCGGAACGTACCATGGAACGTTCCGAATTTCTGGGTTTTTTTGG**A** -3'

sh-antisense-Vinexin-β

5'-**AGCTT**CCAAAAAAACCCAGAAATTCGGAACGTTCCATGGTACGTTCCGAATTTCTGGGT**G** -3'

scrambled-shRNA (Kontrolle):

scr-sense-Vinexin-β

5'- **GATCC**ACCCAGAAATGAGGAACGTACCATGGAACGTTCCATTTCTGGGTTTTTTTGG**A** -3'

scr-antisense-Vinexin-β

5'- **AGCTT**CCAAAAAAACCCAGAAATGAGGAACGTTCCATGGTACGTTCCATTTCTGGGT**G** -3'

Zum *knockdown* von Galectin-1 aus *Homo sapiens*:

sh-sense-Galectin-1

5'-**GATCC**GCTGCCAGATGGATACGAAACCATGGATTTCGTATCCATCTGGCAGCTTTTTTGG**A** -3'

sh-antisense-Galectin-1

5'-**AGCTT**CCAAAAAAGCTGCCAGATGGATACGAAT**CCATGG**TTTCGTATCCATCTGGCAGCG-3'

scrambled-shRNA (Kontrolle):

scr-sense-Galectin-1

5'-**GATCC**GCTGCCAGAT**CCATACGAAACCATGG**ATTCGTAT**GGATCTGGCAGCTTTT**TGG**A**-3'

scr-antisense-Galectin-1

5'-**AGCTT**CCAAAAAAGCTGCCAGAT**CCATACGAATCCATGG**TTTCGTAT**GGATCTGGCAGCG**-3'

(**rot**: eingefügte Restriktionsschnittstellen bzw. -enden; unterstrichen: sense- und antisense-Sequenzen für einen Haarnadel-Stamm; **blau**: ausgetauschte Basen)

3.9 Enzyme

<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/μl)	Stratagene (Heidelberg)
Shrimp Alkalische Phosphatase (1 U/μl)	Roche Molecular Diagnostics (Mannheim)
T4 DNA Ligase (400 U/μl)	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/μl)	Qiagen (Hilden)
T4-Poly-Nukleotid-Kinase (10U/μl)	New England Biolabs (Schwalbach)
Reverse Transkriptase (4 U/μl)	Qiagen (Hilden)

3.10 Antikörper

3.10.1 Primärantikörper

Tab.3.1: Liste der verwendeten Primärantikörper.

Antigen	Organismus/Typ	Verdünnung	Bezugsquelle
Akt	Maus, IgG	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, US)
β-Catenin	Maus, IgG	1:500	BDTransductionLaboratories (Heidelberg, D)
c-myc	Kaninchen, IgG	1:1000	Millipore (Billerica, USA)
CyclinD1	Maus, IgG	1:200	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
ERK1,2	Kaninchen, IgG	1:500	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Galectin-1	Kaninchen, IgG	1:200	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
GST-Tag	Maus, IgG	1:1000	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
HA-Tag	Maus, IgG	1:1000	Roche (Mannheim D)

JNK	Kaninchen, IgG	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, US)
Myc-Tag	Maus, IgG	1:5	aus Zellkulturüberstand
NFκB	Kaninchen, IgG	1:500	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
p38/SAPK	Kaninchen, IgG	1:500	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, US)
p70S6	Maus, IgG	1:1000	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
phospho Akt	Kaninchen, IgG	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, US)
phospho ERK1,2	Maus, IgG	1:500	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
phospho JNK	Kaninchen, IgG	1:500	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, US)
phospho p38/SAPK	Kaninchen, IgG	1:500	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, US)
phospho p70S6	Maus, IgG	1:1000	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Rac	Maus, IgG	1:500	BDTransductionLaboratories (Heidelberg, D)
Ras	Maus, IgG	1:500	Calbiochem (Bad Soden, D)
Sos	Kaninchen, IgG	1:1000	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Tiam C-16	Kaninchen, IgG	1:1000	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
TIMP1	Kaninchen, IgG	1:500	Acris Antibodies (Herford, D)
TIMP2	Maus, IgG	1:200	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
α-Tubulin	Maus, IgG	1:5000	Abcam (Cambridge, UK)
Vinexin-β	Ziege, IgG	1:200	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)

3.10.2 Sekundärantikörper

Tab. 3.2: Liste der verwendeten Sekundärantikörper.

Antigen	Organismus/Typ	Verdünnung	Bezugsquelle
Maus-HRP	Ziege	1:3000	Promega GmbH (Mannheim, D)
Kaninchen- HRP	Ziege	1:3000	Promega GmbH (Mannheim, D)
Maus-IR	Ziege	1:10 000	Li-COR (Bad Homburg, D)

Dye800/680			
Kaninchen-IR Dye 800/680	Ziege	1:10 000	Li-COR (Bad Homburg, D)
Goat-HRP	Esel	1:10 000	SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Goat-IR Dye 680	Esel	1:10 000	Li-COR (Bad Homburg, D)

3.11 Kitsysteme

DyeEx Spin Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, D)
ECL Western Blotting Detection System	Roche (Mannheim, D)
RNase free DNase Set	Qiagen (Hilden, D)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit	Qiagen (Hilden, D)
Dual Luciferase Assay Kit	Promega (Mannheim, D)

3.12 Nährmedien

3.12.1 Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Flüssigmedium	25 g Luria Broth Base (Sigma) auf 1000ml H ₂ O, pH 7.4 nach Bedarf 100 µg/ml Ampicillin
LB-Amp-Agar-Platten	40 g Luria Agar Base (Sigma) auf 1000 ml H ₂ O 50 µg/ml Ampicillin
SOB-Flüssigmedium <i>Super Optimal Broth</i>	0,5 % Hefeextrakt 2% Trypton 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂

	10 mM MgSO ₄	pH 6.8 - 7
SOC-Flüssigmedium	SOB-Medium 20 mM Glucose	
TSS-Lösung zur Herstellung kompetenter Bakterien	85% (v/v) LB-/SOC-Medium 10 (w/v) PEG 8000 50 mM MgCl ₂ 4 % (v/v) DMSO	

3.12.2 Nährmedien, Antibiotika und Zusätze für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
RPMI	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
Geneticin (G418)	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
Zeocin	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
L- Glutamin	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
Penicillin / Streptomycin- Lösung	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
OptiMEM	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
nicht essentielle Aminosäuren	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
Pyruvat	Gibco BRL (Paisley, Schottland)
Blasticidin	Invitrogen (Darmstadt, D)

3.13 Biologisches Material

3.13.1 Bakterienstämme

***E. coli* DH5αF':**

F'end A1hsdR17rk-mk+supE44thi-1recA1gyrA relA_(lacZYA-argF)U 169 (Φ80_(lacZ)M15)
(Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA)

***E. coli* 10-β (High Efficiency):**

*araD139 Δ(ara,leu)7697 fhuA lacX74 galK16 galE15 mcrA f80d(lacZΔM15)recA1 relA1 endA1
nupG rspL rph spoT1Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)*

(NEB, Schwalbach, D)

3.13.2 Zelllinien

Tab. 3.3: Liste über die verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Organismus	Organ	Bezugsquelle	Anmerkungen
BA-HAN-1C	<i>Rattus norvegicus</i>	Muskel	Gerharz <i>et al.</i> , (1988)	Rhabdomyosarkom-zelllinie
BPH	<i>Homo sapiens</i>	Prostata	Prof. W. Schulz, Düsseldorf	Benigne Prostatahyperplasie
COS-7	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Niere	ATCC	Durch SV40 transformiert
HEK293	<i>Homo sapiens</i>	Niere	PD Dr. C. Mahotka, Düsseldorf	embryonale Epithelzelllinie, die durch Adenovirus 5 transformiert ist
LNCaP	<i>Homo sapiens</i>	Prostata	ATCC	Karzinomzelllinie
PC-3	<i>Homo sapiens</i>	Prostata	Prof. W. Schulz, Düsseldorf	Karzinomzelllinie
DusCol-1B	<i>Homo sapiens</i>	Kolon	Engers <i>et al.</i> , (2001)	Karzinomzelllinie
clearCa-28	<i>Homo sapiens</i>	Niere	Engers <i>et al.</i> , (2001)	Karzinomzelllinie

3.14 Internetadressen / Webtools

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

National Center for Biotechnology
Information

<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>

Webcutter

http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

Reverse Complement

<http://www.invitrogen.com>

Vector NTI

<http://rsbweb.nih.gov/ij/>

Download von Image J

<http://www.addgene.org/pgvec1>

Vectorpedia

<http://www.ensembl.org/index.html>

Ensembl

<http://www.expasy.ch/>

Molecular Biology Server

<http://www.genelink.com>

shRNA-Design

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wird in einem Spektralphotometer unter Anwendung des *Lambert-Beerschen* Gesetzes ermittelt:

$$c = E \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{1}{d}$$

(E = spezifischer Extinktionskoeffizient $E = \log \frac{I_0}{I}$; c = molare Konzentration der Lösung [mol/l]; ε = molarer Extinktionskoeffizient [1000 cm²/mol]; d = Schichtdicke der Küvette [cm]; I_0 = Intensität des einfallenden Lichts; I = Intensität des austretenden Lichts)

Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm haben die aromatischen Ringe der DNA ihr Absorptionsmaximum. Aus einer Schichtdicke von $d = 1$ cm ergeben sich daher folgende Näherungswerte: 1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA. Die Messung erfolgte in einer geeigneten Verdünnung der Nukleinsäurelösung gegen eine Referenzlösung in einer Halbmikroküvette (UVette), wobei Absorptionswerte zwischen 0,1 und 1 im linearen Messbereich liegen. Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt Aufschluss über Verunreinigung der Nukleinsäurelösung durch Proteine, die ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm haben. Bei einer „reinen“ DNA-Lösung liegt der OD₂₆₀/OD₂₈₀ –Quotient zwischen 1,8 und 2,0, da dieser zusätzlich durch den Salzgehalt der Lösung und den pH-Wert beeinflusst wird (Wilfinger *et al.*, 1997).

4.1.2 Polymerase-Kettenreaction (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifizierung von definierten Nukleinsäurebereichen (Saiki *et al.*, 1988). Diese Bereiche werden durch chemisch synthetisierte Oligonukleotide (*Primer*) flankiert. Die Primer sollten mindestens 18 bp lang sein und dürfen weiterhin nicht zur Ausbildung interner „Haarnadel“-Strukturen oder Primer-Dimeren befähigt sein. Dies würde zu einer Verringerung der Konzentration an freien Primern im PCR-Ansatz führen. Mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen (z.B. *Taq*

aus *Thermus aquaticus* oder *Pfu* aus *Pyrococcus furiosus*) wird in einem mehrstufigen zyklischem Prozess – bestehend aus Denaturierung einer DNA-Matrize (= *template*), Primer-Hybridisierung (*annealing*) und unter Einbau von dNTPs (*elongation*) – ein neuer DNA-Strang synthetisiert. Im Standard-PCR-Programm erfolgt zunächst eine Trennung der dsDNA durch Denaturierung bei 95°C für 10 min. Durch ein Senken der Temperatur wird die Bindung beider Primer an das Template ermöglicht. Diese liegt normalerweise zwischen 50°C und 60°C und ist im Wesentlichen abhängig vom GC-Gehalt der Primersequenz. Für Primer mit einer Länge bis zu 20 bp kann die Schmelztemperatur T_m mit folgender Formel berechnet werden:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (C + G)$$

Die Schmelztemperatur für längere Primer wird mit folgender Formel berechnet (Baldino *et al.*, 1989):

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 16,6 \cdot (\log_{10} [J +]) + 0,41 \cdot (\% G + C) - \frac{675}{n} - (\% \text{ Fehlpaarung}) - 0,63 \cdot (\% \text{ FA})$$

(J = Konzentration monovalenter Kationen in mol/l; % G+C = Anteil der Basen Guanin und Cytosin in Prozent; n = Anzahl der Basen im Oligonukleotid; % Fehlpaarungen = Anteil der fehlgepaarten Basen in Prozent; % FA = Anteil des Formamids im Puffer in Prozent, entfällt normalerweise bei der PCR)

Die Annealing-Temperatur sollte 5 - 10°C niedriger gewählt werden, als die errechnete Schmelztemperatur (Rychlik *et al.*, 1990). Die Synthese eines neuen DNA-Strangs erfolgt durch den Einbau freier dNTPs im Ansatz durch die *Taq*- bzw. *Pfu*-Polymerase bei 72°C. Die Elongationszeit sollte anhand der Größe des zu erwartenden Produktes gewählt werden (0,5-1 min/kb bei *Taq*; 2min/kb bei *Pfu*). Je nach Experiment unterscheiden sich also die Annealing-Temperaturen, die Dauer der einzelnen Schritte und die Anzahl der PCR-Zyklen. Diese liegen in der Regel bei 25-30 Wiederholungen und können optional durch einen terminalen Elongationsschritt ergänzt werden.

Zur Optimierung der PCR kann einem Ansatz optional DMSO oder BSA beigelegt werden. Das so entstandene PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese (siehe 4.1.4.1) auf seine Reinheit und korrekte Größe überprüft. Gab es nur ein Produkt mit der richtigen Größe, so konnte es nach entsprechender Aufreinigung (siehe 4.1.3) für die Ligation in einen entsprechenden Vektor weiter verwendet werden. Wurden im Agarosegel mehrere

Produkte aufgetrennt, so wurde das Produkt mit der richtigen Größe einzeln aus dem Gel eluiert (siehe 4.1.4.2).

4.1.3 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Im Anschluss an eine PCR- oder anderen enzymatischen Reaktion wurde die DNA mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kits“ (Qiagen) von nicht eingebauten Nukleotiden, Oligonukleotiden und Salzen aus den verwendeten Puffern gereinigt. Dabei wird die DNA unter sauren Bedingungen in einem Hochsalzpuffer an eine Silica-Gel-Membran gebunden, gewaschen und anschließend unter Verwendung eines Niedrigsalzpuffers oder dH₂O von der Säule eluiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt, in der parallel ein DNA-Standard aufgetragen wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1 bis 2 % ige (w/v) Agarosegele in 1 x TBE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Anschließend wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Um die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde das Agarosegel nach dem Lauf für mindestens 5 min in eine Ethidiumbromidlösung gelegt (siehe 3.4)

4.1.4.1 Analytische DNA-Gelelektrophorese

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der aufgetragenen DNA-Proben wird das Agarose-Gel auf einem UV-Transilluminator ($\lambda = 312 \text{ nm}$) betrachtet und dokumentiert. Durch den Vergleich mit einem zusätzlich aufgetragenen DNA-Standard mit Fragmenten definierter Größe kann die Länge von DNA-Fragmenten aus einem Restriktionsverdau abgeschätzt werden.

4.1.4.2 Präparative DNA-Gelelektrophorese

Die präparative Gelelektrophorese dient der Isolierung eines DNA-Fragments aus dem Gel und wird auch Gelelution genannt. Sie dient dem Herauslösen eines DNA-Fragments aus einem Agarose-Gel, um dieses dann weiter, z. B. in Klonierungen, einsetzen zu können. Dazu wird ein DNA-Fragment im Agarosegel entsprechend seiner Laufgröße identifiziert und mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) (vgl. 3.11) nach Angaben des Herstellers. Bei

hohen Salzkonzentrationen ist die DNA in der Lage an die Silica-Membran der eingesetzten Säule zu binden. Alle Verunreinigungen, die nicht an das Säulenmaterial binden, werden unter Niedrigsalz-Bedingungen herausgewaschen. Anschließend kann die aufgereinigte DNA eluiert werden.

4.1.5 DNA-Hydrolyse mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind essentielle Werkzeuge für die DNA-Klonierung. Sie erkennen bestimmte Sequenzen doppelsträngiger DNA und spalten diese durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen beider Stränge. Dabei entstehen je nach Enzym 3'- oder 5'-DNA-Überhänge oder glatte Enden. Allgemein gilt, dass unter optimalen Pufferbedingungen 1 U Enzym 1 µg λ-DNA in 1 h bei 37°C verdaut. Dabei wurden die Versuchsparameter nach den von den Herstellern angegebenen Bedingungen gewählt. Es wurden sowohl Einfach- und je nach Kompatibilität der Pufferbedingungen auch Mehrfachrestriktionen durchgeführt. Bei unvereinbaren Reaktionsbedingungen wurde erst das Enzym mit den niedrigeren Salzbedingungen eingesetzt und dann die Pufferbedingungen für das zweite Enzym angepasst. Alternativ wurde die DNA vor dem zweiten Restriktionsverdau je nach Größe des Fragments über das „QIA MiniPrep Spin Kit“ oder das „QIAquick PCR Purification Kit“ aufgereinigt. Die erhaltenen Spaltprodukte wurden auf einem Agarose-Gel (siehe 4.1.4.1) auf ihre Größe hin überprüft und gegebenenfalls durch Gelelution (siehe 4.1.4.2) extrahiert und gereinigt.

4.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Dephosphorylierung erfolgte direkt nach dem Restriktionsverdau im Restriktionsansatz. Dieser wurde 1:10 mit 10 x SAP-Puffer und 0,5 U/µg Vektor-DNA SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert und der gesamte Ansatz über das „QIA MiniPrep Spin Kit“ aufgereinigt.

4.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die DNA-Ligase des T4-Phagen verwendet. Diese katalysiert in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} -Ionen die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxyl- und den 5'-Phosphatenden der DNA. Die Mengen der einzusetzenden DNA wurden mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{ng}_{[\text{Insert}]} = \frac{\text{ng}_{[\text{Vektor}]} \times \text{kb}_{[\text{Insert}]}}{\text{kb}_{[\text{Vektor}]}} \times \text{Verhältnis} \left[\frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \right]$$

Die Ligation erfolgte in kleinem Endvolumen von idealerweise 20 µl. Dafür wurden etwa 100-200 ng Vektor-DNA, eine entsprechende Menge des zu ligierenden DNA-Fragments (= Insert) (im drei- bis fünffachen Überschuss zum Vektor), 2 µl 10 x Ligase-Puffer und 2 U T4-DNA Ligase standardmäßig bei 2-4 h bei RT oder bei 16°C üN inkubiert. Für die Klonierung der sh-RNA-Konstrukte wurden die Ligationsansätze üN bei RT inkubiert. Die Ligationsansätze wurden anschließend in kompetente Bakterien transformiert (siehe 4.4.3).

4.1.8 Hybridisierung komplementärer Oligodesoxynukleotide

Die Hybridisierung von synthetisch hergestellten, komplementären Oligodesoxynukleotiden erfolgte unter Einsatz von je 3 µg beider Oligodesoxynukleotide, in *Annealing-Puffer* in einem Endvolumen von 50 µl. Die Ansätze wurden im PCR-Gerät für 2 min auf 94°C erhitzt und anschließend schrittweise auf 4°C abgekühlt, wobei die Hybridisierung der Einzelstränge erfolgt. Diese wurden anschließend phosphoryliert (siehe 4.1.9) und in die entsprechenden (dephosphorylierten) Vektoren ligiert (siehe 4.1.7), bevor der Ansatz in kompetente Bakterien transformiert wurde (4.4.3).

4.1.9 Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden

Bevor miteinander hybridisierte Oligonukleotide in einen entsprechenden Vektor ligiert werden konnten, mussten sie phosphoryliert werden, soweit der Vektor nach entsprechendem Restriktionsverdau dephosphoryliert wurde. Dazu wurden 40 µl des Annealing-Ansatzes in 10x PNK-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 5 µl ATP [10 mM] und 2 µl T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) [10 U/µl] hinzugegeben und der Ansatz mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die PNK katalysiert den Phosphat-Transfer von ATP an das 5'-Hydroxylende von Polynukleotiden wie DNA oder RNA. Die Phosphorylierung erfolgte für 30 min bei 37°C, danach wurde der Ansatz für 20 min bei 70°C hitzeinaktiviert.

4.1.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA nach Sanger *et al.* (1977) wird auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet. Die Matrizen- DNA wurde zusammen mit einem 5'-Sequenzierprimer, DNA-Polymerase und dNTPs in ein Reaktionsgefäß gegeben. Zusätzlich wurden in jedes Reaktionsgefäß fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonucleotide (ddNTPs)

gegeben. Während der Sequenzier-PCR kommt es zu zahlreichen Primerverlängerungen, bei denen das Enzym nicht zwischen dNTPs und ddNTPs unterscheidet. Wird ein ddNTP zur Kettenverlängerung verwendet, so kommt es zum Kettenabbruch, da aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann. Man erhält so eine statistische Mischung aller Kettenlängen an neusynthetisierten DNA-Fragmenten, die mit einer fluoreszenzmarkierten Base enden. Mittels Kapillarelektrophorese werden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt und aufgrund der Fluoreszenzmarkierung kann die Nukleotidsequenz ermittelt werden.

Die in dieser Arbeit sequenzierten Proben wurden als Auftragsarbeit an das Biomedizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf) oder die Firma GATC-Biotech AG (Konstanz) gegeben.

4.1.11 Klonierung von shRNA in pSUPER bzw. pRETROSUPER

4.1.11.1 RNA-Interferenz

Mittels RNA-Interferenz (RNAi) können Gene sequenzspezifisch auf posttranskriptionaler Ebene herunterreguliert oder sogar ausgeschaltet werden (*gene silencing*). Man spricht auch von einem *knockdown* eines Gens. siRNAs (=Small Interfering RNA) von ca. 21 -23 Nt entstehen in der Zelle durch die Spaltung langer dsRNA durch das RNase III-ähnliche Enzym Dicer (siehe Abb. 4.1). Die siRNA-Duplexe haben am 3'-Ende Überhänge von 2-3 Nt und charakteristisch sind die 3'-OH- und die 5'-Phosphatgruppen (Schwarz *et al.*, 2003, Zamore *et al.*, 2000). Sie werden in den Multiproteinkomplex RISC (*RNA-Inducing-Silencing-Complex*) eingebaut und entwunden. Die nun einzelsträngig vorliegende siRNA leitet den gesamten Komplex zu seiner komplementären Ziel-mRNA, die darauf hin gespalten wird (Martinez *et al.*, 2002). Dadurch wird die Translation des entsprechenden Genprodukts verhindert. Elbashir *et al.* (2001a) konnten zeigen, dass mit siRNA-Molekülen aus genau 21 Nukleotiden ein *knockdown* komplementärer mRNA erreicht wird, ohne dabei eine eukaryotische Interferon-Antwort zu induzieren. RNAi kann in eukaryotischen Zellen durch die Transfektion von synthetisch hergestellten siRNA-Molekülen oder shRNA-Expressionsvektoren ausgelöst werden. Im zweiten Fall wird das RNAi-induzierende Molekül erst in der Zelle transkribiert. Dabei steht die shRNA-kodierende Sequenz unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase III-Promotors. Das ist besonders geeignet, weil die RNA-Polymerase III eine einfache Basenabfolge von vier oder mehr Thymidin-Basen als Terminator-Sequenz erkennt. Die

transkribierte shRNA wird von Dicer erkannt und führt anschließend in der oben beschriebenen Reaktion zu einer sequenzspezifischen Spaltung der entsprechenden mRNA.

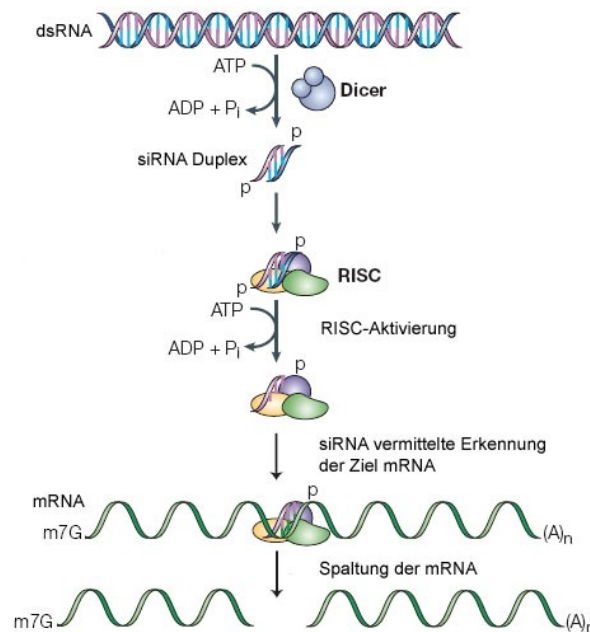


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz. In der Zelle vorkommende lange (> 30 bp) dsRNA wird durch das RNase-ähnliche Enzym Dicer erkannt und in kleine siRNA-Duplexe geschnitten. Diese werden in den RISC-Komplex eingebaut und entwunden. Der so aktivierte Komplex vermittelt die Erkennung komplementärer mRNA, die erst gebunden und in einem weiteren Schritt gespalten wird. (modifiziert nach: Dykxhoorn *et al.*, 2003).

4.1.11.2 Design der Oligonukleotide für den knockdown durch sh-RNA

Für den *knockdown* von Vinexin- β und Galectin-1 wurde nach Anleitung des pSuper RNAi-Systems (www.oligoengine.com) jeweils genspezifische Haarnadelstrukturen-codierende Sequenzen zunächst hinter den H1-Polymerase III Promotor des pSuper-Vektors kloniert. Um die spezifische Herunterregulation der jeweiligen Gentranskripte zu erreichen, wurden Oligonukleotide generiert, die eine einzigartige 19-Nt-Zielsequenz beinhalten (Abb. 4.2). Die 19-Nt-Zielsequenz ist komplementär zu der entsprechenden Sequenz in der mRNA. Die Sequenz des *sense*-Oligonukleotids besteht aus der 19-Nt-Zielsequenz sowohl in *sense*- als auch in *antisense*-Orientierung. Beide Sequenzen innerhalb des Oligonukleotids wurden durch eine acht Nt lange Sequenz unterbrochen, die eine sechs Nt-Restriktionsschnittstelle für *NcoI* enthielt (**ACCATGGA**). Diese Sequenz verursacht die Ausbildung eines *loops*. Die Restriktionsschnittstelle erleichtert die Sequenzierung der klonierten sh-Expressionsvektoren. Das *sense*-Oligonukleotid hatte am 5'-Ende einen *BamHI*-Überhang,

das *antisense*-Oligonukleotid hatte am 5'-Ende einen *HindIII*-Überhang. Der Aufbau der Oligonukleotide war also wie folgt für das *sense* Oligo: 5'-**GATCC** [G/A] N₁₉ **ACCATGGA** N₁₉ [G/A/C] TTTTGGGA-3' und für das komplementäre Equivalent *antisense* Oligo: 5'-**AGCTTCCAAAAA** [G/A/C] N₁₉ **TCCATGGT** N₁₉ [G/A] **G**-3'. Jeder Duplex beinhaltete eine Transkriptionsinitiationsbase (G oder A), die für eine effiziente Initiation der Transkription durch die RNA-Polymerase III erforderlich ist. Sie wurde nur eingefügt wenn die erste Base der kodierenden Sequenz keine Purinbase war. Im Duplex folgten die sh-codierende Region (*sense-loop-antisense*), ein *Terminationsspace* (falls erforderlich G/A/C), der nur eingefügt wurde wenn die letzte Base der codierenden Region ein T war, und ein Terminationssignal von fünf Thymidin-Basen (McIntyre and Fanning, 2006).

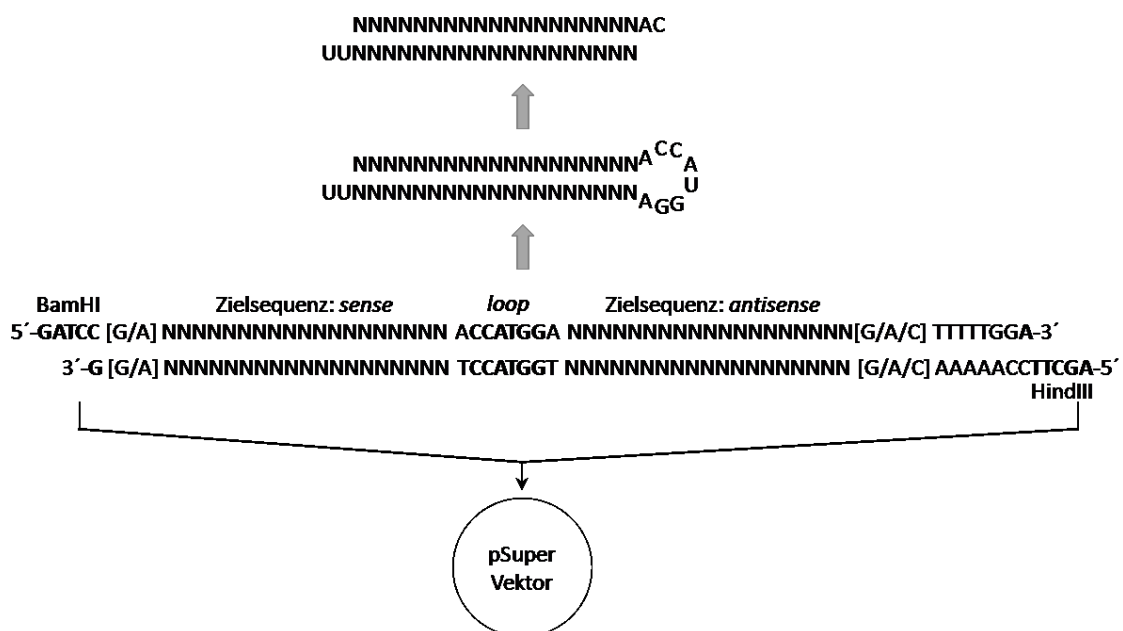


Abb. 4.2: Mechanismus der shRNA. Die hybridisierten Oligonukleotide werden in den mit BglIII und HindIII linearisierten pSuper Vektor ligiert. Die Transkription der DNA resultiert in einer shRNA, die in der Zelle in funktionelle siRNA weiterverarbeitet wird (modifiziert nach pSUPER: Manual; www.oligoengine.com).

Nach Auswahl der entsprechenden Zielsequenz wurde das Insert aus zwei synthetisch hergestellten zueinander komplementären Oligonukleotiden in einer Annealing-Reaktion miteinander hybridisiert (siehe 4.1.8). Die hybridisierten Fragmente konnten dann in den mit *BglIII*- und *HindIII*-verdauten pSuper-Vektor hinter den H1-Promotor ligiert werden (bei RT/ÜN). Um den Hintergrund nach der Transformation zu reduzieren, wurde das Plasmid vor der Transformation in kompetente Bakterienzellen (siehe 4.4.3) für 30 min bei 37°C mit 1 µl *BglIII* verdaut. Da *BamHI* und *BglIII* den gleichen Überhang haben (GATC), konnte das Insert

problemlos in den Vektor ligiert werden. Nach erfolgreicher Ligation wurde allerdings die Restriktionsschnittstelle für *BglII* (AGATCT) durch den *BamHI*-Überhang des Inserts (GATCC) zerstört, so dass nach Inkubation mit *BglII* nur Plasmide transformiert werden konnten, die das Insert besitzen. Der Erfolg der Klonierung wurde nach einer Plasmid-Mini-Präparation (siehe 4.4.6) zuerst durch Restriktionsanalyse mit *EcoRI* (siehe 4.1.5) und anschließende Sequenzierung des Plasmids (siehe 4.1.10) überprüft.

4.1.11.3 **Subklonierung der shRNA von pSUPER in pRETROSUPER (pRS)**

Nach der Ligation in pSUPER wurde das Insert zusammen mit dem H1-Promotor aus dem Vektor heraus geschnitten und in den hydrolysierten und gereinigten pRETROSUPER-Expressionvektor ligiert. Der Vektor wurde anschließend in kompetente Bakterienzellen transformiert und der Erfolg der Klonierung durch einen Kontrollverdau und Sequenzierung (siehe 4.1.10) überprüft. Zur Kontrolle der shRNA-Spezifität wurde zusätzlich ein Vektor mit einer „mismatch“ shRNA-Sequenz kloniert. Laut Brummelkamp *et al.* (2002) wird bereits durch einen einzigen Basenaustausch in der shRNA kein *knockdown* der Ziel-mRNA mehr beobachtet.

4.1.12 **RNA-Isolierung**

Für die vorliegende Arbeit wurde RNA aus verschiedenen eukaryotischen Zelllinien isoliert, um anschließend Expressionuntersuchungen mittels Real-Time-PCR am Light Cycler (Roche) durchzuführen. Die Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen). Die Zellen wurden mit einer Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in PBS gewaschen. Max. 1×10^6 COS-7-Zellen wurden in RLT-Puffer unter Zugabe von β -Mercaptoethanol lysiert. Nach der Homogenisierung des Lysats über QIAshredder-Säulen (Qiagen) wurde die RNA über eine Silica-Membran nach Herstellerangaben eluiert und anschließend bei -80°C gelagert.

4.1.13 **RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte analog zur Bestimmung der DNA-Konzentration (siehe 4.1.1). Auch hier wurde die Reinheit der isolierten RNA überprüft. Der Quotient von E_{260}/E_{280} hat idealerweise einen Wert zwischen 1,8 und 2,0.

4.1.14 **Reverse Transkription-PCR**

Mit Hilfe der Reversen-Transkription-PCR (RT-PCR) wird isolierte RNA in die dazu komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese kann dann als Template für eine PCR

oder eine quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) eingesetzt werden. Durch die Auswahl von Oligo-dT-Primern wird dabei nur die *messenger* RNA (mRNA) in cDNA transkribiert. Diese Primer enthalten 15 bis 25 Thymidin-Basen komplementär zum Poly-(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA. Die Reaktion erfolgte mit dem Omniscript RT-PCR Kit der Firma Qiagen.

Tab. 4.1: Pipettierschema für eine RT-PCR nach Angaben des Herstellers

Reagenzien	Volumen [μ l]
10 x RT Puffer	2
dNTPs [10mM]	2
Oligo-dT-Primer [10 pmol/ μ l]	0,75
RNAse Inhibitor [10 U/ μ l]	0,25
Reverse Transkriptase [4 U/ μ l]	1
RNA-Template	1-2 μ g
H ₂ O	ad. 20

Der Ansatz wurde für 60 min bei 37°C im PCR-Gerät inkubiert und die cDNA anschließend bei -20°C gelagert.

4.1.15 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) wird häufig für die Expressionanalyse eingesetzt, da so z. B. mRNA-Mengen verschiedener Proben quantitativ verglichen werden können. Im Gegensatz zur Endpunktanalyse konventioneller PCR-Reaktionen ermöglicht die qRT-PCR eine kinetische Quantifizierung der Produktmenge während der exponentiellen Phase einer PCR. Hier wird also nicht eine absolute Produktmenge bestimmt, sondern die Produktbildung während der PCR mittels Fluoreszenz-Messungen verfolgt (Echtzeit-Detektion). In dieser Arbeit wurde dem PCR-Ansatz der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green zugefügt, der unabhängig von der Sequenz in die kleine Furche doppelsträngiger DNA interkaliert und Licht bei 520 nm emittiert. Dadurch korreliert die Zunahme des Produkts je Zyklus mit der Zunahme der Fluoreszenz. Durch eine Schmelzpunktanalyse konnte im Anschluss an die eigentliche PCR die Reinheit des Produktes überprüft werden. Dazu wurde das Reaktionsgemisch schrittweise bis auf 95°C erhitzt und dabei kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Die Trennung der komplementären DNA-Stränge bei der jeweiligen Schmelztemperatur (T_m) hat die Freisetzung der interkalierten SYBR Green I-Moleküle zur

Folge, was anschließend zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. Die PCR-Komponenten wurden nach folgendem Ansatz in Plastikpipetten pipettiert:

Tab. 4.2: Pipettierschema für qRT-PCR

Reagenzien	Volumen [µl]
SYBR Green <i>PCR Master Mix</i>	10
Primer sense [10 pmol/µl]	1
Primer antisense [10 pmol/µl]	1
BSA [1 µg/µl]	1
cDNA [10 ng/µl]	2
H ₂ O	ad 20

Alle qRT-PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe des FastStart DNA Master SYBR Green I-Kits (Roche Diagnostics) durchgeführt. Die verwendeten Primerpaare wurden so gewählt, dass sie ähnliche Schmelztemperaturen (ca. 60°C) hatten und zu Produkten von ca. 100 bp führten. Bei erstmaliger Verwendung eines Primerpaares sollte das entstandene Produkt im Anschluss an die qRT-PCR sequenziert werden. Zur Normalisierung der Expression wurde GAPDH als Haushaltsgen separat amplifiziert. Folgendes PCR-Programm wurde für die qRT-PCR angewendet:

Tab. 4.3: PCR-Programm für quantitative Real-Time PCR

Temperatur [°C]	Zeit	
95	2 min	Denaturierung
94	5 s	Denaturierung
54-60	10 s	Annealing*
72	10 s	Elongation

} 40 Zyklen

*Die Annealing-Temperatur richtete sich nach der individuellen Schmelztemperatur der verwendeten Primerpaare und kann daher von der angegebenen Temperatur abweichen (siehe 3.8.)

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen (25 cm² bzw. 75 cm²) im Brutschrank bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Zellkulturmedien sowie Zusätze für die Zellkultur sind in 3.12.2 gesondert aufgeführt.

4.2.1.1 *Kryokonservierung*

Um eukaryotische Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg zu konservieren, wurden diese in einer 10 %igen (v/v) DMSO-Lösung im jeweiligen Medium in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu werden etwa 1×10^6 Zellen als Zellsuspension in ein Kryoröhrchen gegeben. DMSO dient als Gefrierschutzmittel, indem es sich um die Zellkompartimente legt und damit verhindert, dass die Zellen durch eingedrungene Eiskristalle irreparabel geschädigt werden. Ideal ist ein Abkühlen um 1°C /min. Hier wurden die Zellen in dem Kryoröhrchen erst auf Eis gegeben, anschließend für mehrere Stunden bei -20°C und dann über Nacht bei -80°C gelagert. Erst dann erfolgte die Überführung in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff.

4.2.1.2 *Rekultivierung*

Zur Rekultivierung der Zellen wurde das Kryoröhrchen direkt aus dem Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Um das DMSO von den Zellen zu entfernen, wurde den aufgetauten Zellen normales Zellkulturmedium zugesetzt um sie anschließend 5 min bei 500 x g zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in Zellkulturmedium resuspendiert und in ein geeignetes Zellkulturgefäß mit 0,2 ml Medium/cm² Fläche überführt. Am folgenden Tag wurde das Medium erneut gewechselt, um nicht adhärierte Zellen zu entfernen.

4.2.1.3 *Subkultivierung*

Das Zellwachstum wurde regelmäßig unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Bei einer Konfluenz von ca. 90 % wurden die Zellen passagiert, d. h. in einer dem Zellwachstum entsprechenden Verdünnung in ein neues Zellkulturgefäß überführt. Dazu wurden die Zellen erst in PBS gewaschen und anschließend durch eine Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C abgelöst. Die Inkubationszeit richtete sich hier nach der Zelllinie. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium resuspendiert, nach Bedarf verdünnt und in ein neues Zellkulturgefäß mit frischem Medium überführt.

4.2.1.4 **Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nachdem die Zellen trypsinisiert und in frischem Zellkulturmedium resuspendiert wurden (siehe 4.2.1.3), wurde eine Probe abgenommen und mit Trypanblau (Gebrauchslösung 0,2 %) verdünnt. Ein Tropfen der Verdünnung wurde unter das Deckglas der Zählkammer gegeben und die Zellen in den vier großen Eckquadraten auf einer Hälfte der Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl wurde somit viermal bestimmt. Der Mittelwert der Zellzahl wurde mit dem Faktor 10^4 [Zellen/ml] multipliziert, der sich aus dem gegebenen Volumen der Suspension unter dem Deckglas ergibt. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung wird so die Zellzahl/ml Medium berechnet.

4.2.2 **Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen**

4.2.2.1 **Transfektion mit DEAE-Dextran**

In dieser Arbeit wurden ausschließlich COS-7-Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode transient transfiziert und 48-72 h nach der Transfektion lysiert. Am Tag vor der Transfektion wurden $7,5 \times 10^5$ - 10^6 Zellen in Zellkulturschalen ($\varnothing$ 10 cm) ausgesät, mit 8 ml Zellkulturmedium versetzt und bis zum nächsten Tag bei 37°C inkubiert. Für die Transfektion wurden 3 µg Gesamt-DNA-Menge eingesetzt, wobei je nach Versuch verschiedene Kombinationen transfiziert wurden. Die verwendete DNA stammte hierbei ausschließlich aus Plasmid-Maxi-Präparationen. In ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 593 µl PBS, 3 µg DNA [1µg/µl] und 4 µl DEAE-dextran-Lösung [0,1 M] vorgelegt und auf dem Vortexer gemischt. Nachdem das Medium von den Zellen entfernt wurde und diese zweimal mit PBS gewaschen wurden, wurde der DNA-Ansatz auf die Zellen gegeben. Dabei sollte darauf geachtet werden das PBS vorher vollständig zu entfernen, um den DNA-Ansatz nicht zu verdünnen. Das positiv-geladene DEAE-dextran bildet zusammen mit der negativ-geladenen DNA Komplexe, die sich an der negativ-geladenen Zellmembran anlagern und anschließend durch Endocytose von der Zelle aufgenommen werden. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte eine Zugabe von 0,13 mM Chloroquine in DMEM ohne Zusätze und eine weitere Inkubation für 2,5 h bei 37°C. Das positiv geladene Chloroquine hemmt die Verschmelzung der Transportvesikel mit Lysosomen und somit die vorzeitige Degradation der zellfremden DNA. Nach der Inkubationszeit wurde der gesamte Ansatz vorsichtig von

den Zellen entfernt und den Zellen frisches Wachstumsmedium für mindestens 24 h zugegeben.

4.2.2.2 **Transfektion durch $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation**

Die transiente Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte mit der Calcium-Phosphat-Methode nach Jordan *et al.* (1996). Einen Tag vor der Transfektion wurden $1,2 \times 10^6$ HEK293-Zellen in Zellkulturschalen ($\varnothing$ 10 cm) mit 8 ml Medium ausgesät und bis zum nächsten Tag bei 37°C inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß eine Gesamt-DNA-Menge von 5 µg [1 µg/µl] in 433 µl dH₂O vorgelegt. Dazu wurden 62 µl CaCl₂-Lösung [2 M] möglichst direkt in die vorgelegte Lösung pipettiert. Danach wurde das Zellkulturmedium von den HEK293-Zellen abgenommen und durch 9 ml frisches Medium mit 5 mM Chloroquine ersetzt. Die Zellen wurden so für 30 min bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden den DNA-Ansätzen tropfenweise und unter regelmäßigem Mischen auf dem Vortexer 2 x HEBS-Puffer zugegeben. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT bilden sich feine $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -DNA-Präzipitate, die anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben wurden. Nach einer Inkubation von ca. 24 h wurde das Medium abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Auch hier wurden je nach Versuch verschiedene DNA-Kombinationen transfiziert und die Zelle 48-72 h nach Transfektion lysiert.

4.2.3 **Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen**

Das Ziel der stabilen Transfektion ist es, individuelle Klone mit der transfizierten DNA zu isolieren. Dazu muss eine Trennung nicht-transfizierter Zellen von solchen, die die fremde DNA aufgenommen haben, erfolgen. Wenn sich im transfizierten Plasmid ein Resistenz Marker befindet, kann eine Trennung erfolgen, indem man mit Hilfe eines Antibiotikums einen Selektionsdruck erzeugt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten PC-3- und LNCaP-Zellen stabil mit verschiedenen Vinexin-β- bzw. Galectin-1- Konstrukten transfiziert werden, um Klone zu erzeugen, die Galectin-1 oder Vinexin-β entweder überexprimieren oder bei denen die Expression durch shRNA herunterreguliert wurde. Die Transfektionen erfolgten mit Eugene oder Lipofectamin für die LNCaP-Zellen und mit Superfect für die PC-3-Zellen nach Angaben der jeweiligen Hersteller. 48-72 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und in entsprechendem Selektionsmedium neu ausplattiert. Das Selektionsmedium wurde regelmäßig gewechselt, um tote Zellen zu entfernen. Nach ca. 10-14 Tagen wurden einzelne Zellkolonien trypsiniert und auf Multiwell-Platten überführt,

damit sie sich unter Selektionsdruck weiter vermehren konnten. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen in jeweils größere Zellkulturgefäße überführt. Einzelne Passagen der stabil transfizierten Zellen wurden kryokonserviert, um einen Pool dieser Zellen zu erhalten (siehe 4.2.1.1).

4.2.4 Immuncytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe dieser Methode wurde die Lokalisation von Proteinen in der Zelle immunologisch untersucht. Dazu wurden 10^5 Zellen auf ein steriles Deckglas in einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät und 24 h später transfiziert. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3,7 % (w/v) Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert und die Zellmembranen durch Inkubation mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 permeabilisiert. Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation mit 1 % (w/v) BSA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern in entsprechender Verdünnung für 1 h bei RT. Nach drei Waschschritten von jeweils 5 min in PBS erfolgte die Inkubation mit den FITC-/ TRITC-fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern in entsprechender Verdünnung für 1 h bei RT im Dunkeln. Auch alle weiteren Waschschrritte und die Anfärbung der Zellkerne mit 4, 6-Diamino-2-phenylindol (DAPI) [0,05 µg/ml in PBS] erfolgten möglichst unter Lichtausschluss. Danach wurde das Deckglas mit *Vectashield* auf einen Objektträger gelegt und die Ränder mit Nagellack fixiert. Bis zur Analyse wurden die Objektträger bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop (Zeiss, Axiovert 211) in Kooperation mit dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf.

4.2.5 Funktionelle Analysen

4.2.5.1 *Migrationsassay*

Migrationsassays wurden in einem Transwellsystem durchgeführt. Dabei mussten die Zellen aktiv eine rekonstruierte Basalmembran überwinden. Das verwendete Transwellsystem ist schematisch in der Abb. 4.3 dargestellt.

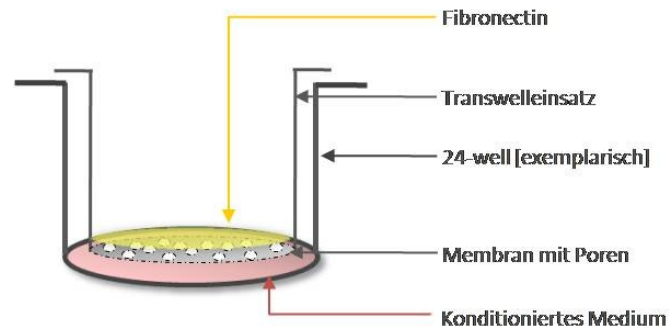


Abb. 4.3: Schematische Darstellung eines Transwellsystems. Die Membran der Transwelleinsätze ist mit Poren mit einem Durchmesser von 8 μm versehen. Sie wird mit Fibronectin beschichtet bevor die Zellsuspension in den Transwelleinsatz gegeben wird. In der unteren Kammer dient konditioniertes Medium als chemischer Lockstoff für die Zellen.

Zur Durchführung der Versuche wurden die Transwells in 24-well-Platten gesetzt und zunächst mit Fibronectin [1 mg/ml] beschichtet. Zur Aushärtung der Lösung wurden sie anschließend für 60 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und für jeden Transwelleinsatz eine Zellsuspension mit 50 000 Zellen in 50 μl OptiMEM hergestellt. In die 24-wells wurden unter den Membraneinsatz jeweils 500 μl konditioniertes Medium¹ pipettiert und die Zellen auf die beschichtete Membran gegeben. Die anschließende Inkubation der Zellen bei 37°C richtete sich nach den verwendeten Zellen und wurde empirisch bestimmt. Um die nicht migrierten Zellen auf der oberen Seite der Membran zu entfernen, wurden die Einsätze vorsichtig mit einem Wattestäbchen gereinigt. Danach wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran in eiskaltem Methanol für 5 min fixiert. Anschließend wurde für 5 Minuten eine Hämatoxylin-Färbung (Zellkern-Färbung) durchgeführt. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit in H₂O (sog. Bläuen) wurden die Membranen für weitere 5 min in Eosin gefärbt, um so das Cytoplasma der Zellen rot anzufärben. Zwischen all diesen Schritten wurden die oberen Seiten der Membranen jeweils mit einem Wattestäbchen gereinigt. Im Anschluss daran wurden die Membranen kurz in H₂O gespült und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 2 x 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %) entwässert. Zum Schluss wurden die Membranen mit einem Skalpell vorsichtig aus den Einsätzen herausgeschnitten,

¹ Konditioniertes Medium wurde hergestellt, indem ca. 80 % konfluente COS-7-Zellen für 24 h mit OptiMEM kultiviert wurden. Danach wurde das Medium für 10 min abzentrifugiert (1200 rpm), aliquotiert und bei -20°C gelagert.

in Xylol getaucht, mit der Unterseite nach oben auf einen Objektträger gelegt und mit Eukitt eingedeckelt. Die migrierten Zellen wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgezählt und die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Für jeden Versuchsansatz wurden $n = 6$ Membranen ausgezählt. In transient transfizierten Zelllinien wurde der Transfektionserfolg zusätzlich mittels Western- und Immunoblot überprüft (siehe 4.3.5 und 4.3.7).

4.2.6 Zymographie

Mithilfe der Zymographie lassen sich Expression und Aktivität der invasionsrelevanten Matrixmetalloproteinasen (MMPs) -2 und -9 semiquantitativ bestimmen. Dafür wurden Zellkulturüberstände genommen und über Ultrafiltrationsröhrchen (*Amicons*) aufkonzentriert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine entsprechende Menge an Protein mit nicht denaturierendem Ladepuffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 8 % -iges SDS-Gel mit einem Anteil von 0,2 % Gelatine aufgetragen. Nachdem das Gel gelaufen war, wurde es auf einem Schüttler in einer 2,5 % -igen Triton-X100-Lösung bei 37°C für 60 min inkubiert um das SDS aus dem Gel zu entfernen. Nach einer halben Stunde wurde die Lösung einmal gewechselt. Anschließend wurde das Gel mit Reaktionspuffer für 36 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt und das Gel für vier Stunden mit Coomassie-Lösung gefärbt. Das enthaltene Coomassie-Blau färbte die Gelatine im Gel blau an. Die durch die abgebaute Gelatine entstandenen Banden wurden dabei nicht angefärbt und sichtbar. Um den Kontrast zwischen dem gefärbten Gel und den ungefärbten Banden zu optimieren, wurde das Gel anschließend solange in Entfärbelösung inkubiert bis die Banden klar erkennbar waren. Das Gel wurde photographiert und danach auf einem weißen Filterpapier mittels Vakuum getrocknet.

4.2.7 Dual-Luciferase®-Reportergen-Assay

Mit Hilfe des Dual-Luciferase-Reportergen-Assays wird die eukaryotische Genexpression eines Reportergens durch die zwei Reporterenzyme *Firefly* (*Photinus pyralis*)-Luciferase und *Renilla* (*Renilla reniformis*)-Luciferase gemessen. Die *Firefly*-Luciferase katalysiert in Anwesenheit von Sauerstoff, ATP und Mg^{2+} die Umwandlung von D-Luziferin in Oxyluziferin, wodurch Licht mit einer Wellenlänge von 550 bis 570 nm emittiert wird (Biolumineszenz). Um die Werte der *Firefly*-Luciferase auf die jeweilige Transfektionseffizienz normieren zu können, wurde in den Transfektionsansätzen 20 ng des Renilla-Expressionsvektors pRL-TK

(Promega) co-transfiziert. Die Bestimmung beider Luciferase-Aktivitäten erfolgte mit dem Dual-Luciferase®-Assay-System (Promega) nach Angaben des Herstellers in einem Luminometer (LB9506). Dabei ist die Lichtemission proportional zur Luciferase-Menge im Zelllysate, und weist somit indirekt auf die Transkriptionsrate des Reportergens und damit auf die Aktivität des untersuchten Promotors hin. Die Werte der *Firefly*-Luciferase wurden dabei relativ zu denen der *Renilla*-Luciferase angegeben.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Tiam1, Vinexin- β und Galectin-1 auf die cytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) untersucht. cPLA₂ führt zu einer Aktivierung des Serum Response Faktors (SRF). In dem durchgeführten Luciferase-Assay wurde die Promotoraktivität indirekt über das Serum Response Element (SREm) bestimmt. Die Durchführung des Assays erfolgte in transient transfizierten COS-7-Zellen (siehe 4.2.2.1) 48 h nach der Transfektion. Die untenstehende Tabelle 4.4 zeigt exemplarisch das Pipettierschema für einen Transfektionsansatz. Um den Transfektionserfolg der eingesetzten Konstrukte zu überprüfen, wurde ein Teil der Lysate abgenommen und mittels Immunoblot analysiert.

Tab. 4.4: Transfektionsansatz für $1,7 \times 10^6$ COS7-Zellen in einem 6-well-Zellkulturformat

Konstrukt/Vektor	Menge cDNA [ng]
SREm- <i>luc</i>	100
pRL-TK- <i>Renilla</i>	20
pMT2SM (versch. Konstrukte)	ad 300

4.2.8 Durchflusszytometrie zur quantitativen Bestimmung von ROS

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen in Suspension durch einen dünnen Probenstrahl fokussiert und passieren einzeln einen Messbereich, der durch einen Laserstrahl beleuchtet wird. Es kommt zu einer Streuung des Lichts, die in einer Fluoreszenzemission resultiert. Das ausgegebene Fluoreszenzsignal wird gemessen und gibt Auskunft über die Eigenschaften der zu untersuchenden Zelle. Die Streuung wird durch verschiedene biologische Parameter, wie Zellgröße, -kern, -membran und Granularität beeinflusst. Zudem können Zelloberflächen-Antigene durch Markierung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Bildung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) in COS-7-Zellen gemessen. Dazu wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen in 6 cm-Schalen wahlweise mit folgenden Konstrukten transient transfiziert: FL-Tiam1,

C1199-Tiam, Vinexin- β und Galectin-1. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Leervektor-transfizierte Zellen im Durchflusszytometer gemessen. 48 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen für 1 h mit 20 mM 2'-7'-Dichlorohydrofluoresceindiacetat (DCF-DA) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, mit PBS gewaschen und in PBS + 0,5 % FCS aufgenommen, bevor sie analysiert wurden. Nachdem DCF-DA von den Zellen aufgenommen wurde, wird die Acetatgruppe durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert (Abb. 4.4). Das nicht fluoreszierende H_2 -DCF wird durch ROS zu dem Fluorochrom DCF oxidiert (Hempel *et al.*, 1999). Durch eine Anregung mit Licht (488 nm) kann so die Fluoreszenz von DCF bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm gemessen werden (Halliwell & Whiteman, 2004). Um die Streuung des Lichts einstellen und die Autofluoreszenz der Zellen beurteilen zu können, wurden zudem unbehandelte Zellen als Kontrolle gemessen. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Programm FloMax®.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteingesamtkonzentration in einer Lösung wurde im Rahmen dieser Arbeit nach der Bradford-Methode ermittelt. Hier interagiert der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 in Phosphorsäure insbesondere mit den Seitenketten von Arginin, aber auch von Histidin, Lysin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin und wird so in seiner anionischen Form stabilisiert (Cromton & Jones, 1985). Dadurch wird das Absorptionsmaximum von 465 nm (rot) nach 595 nm (blau) verschoben. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichgeraden mit verschiedenen Konzentrationen von BSA (Rinderserumalbumin) ermittelt. Zur Messung der Proben wurden diese in einer Doppelbestimmung 1:1000 in Bradford-Reagenz und H_2O (Verhältnis 1:5) verdünnt und nach 5-minütiger Inkubationszeit die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Kontrolle diente der Puffer, in dem die Proteine gelöst wurden. Es wurden nur Werte im linearen Bereich (0,2 – 0,8) berücksichtigt, und anhand der Eichgeraden wurden die Proteinkonzentrationen errechnet.

4.3.2 Co-Immunpräzipitation

In dieser Arbeit wurde die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) angewandt, um Protein-Protein-Interaktionen biochemisch zu untersuchen. Dieser Nachweis erfolgt *in vitro* mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch an ein bestimmtes Protein in einem Zelllysats bindet. Der Antigen-Antikörper-Komplex bzw. Antigen-Antikörper-Interaktionspartner-Komplex wurde anschließend an Protein G oder A Sepharose gekoppelt und konnte so aus einem Zelllysats isoliert werden. Das Protein A bzw. G bindet spezifisch an die Fc-Fragmente der Antikörper, wobei die Bindungsaffinität mit dem Antikörpertyp variieren kann. Hier wurde fast ausschließlich Protein A Sepharose verwendet. Nachdem die Zellen in Zellkulturschalen (Ø 10 cm) ausgesät und anschließend mit – je nach Versuch – verschiedenen Plasmiden transfiziert wurden, wurden sie ca. 48-72 h nach der Transfektion in einem nicht denaturierenden Puffer für 20 min bei 4°C lysiert. Anschließend wurden die Lysate für 5 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Protein-Konzentrationsbestimmung (siehe 4.3.1), wurden die zu vergleichenden Proben mit dem verwendeten Lysepuffer auf gleiche Mengen (500 – 2000 ng) verdünnt. In einem sog. „pre-clearing“-Schritt wurden alle Proteine aus dem Lysat entfernt, die unspezifisch an die Protein A/G Sepharose binden. Dazu wurde die Protein A/G Sepharose erst in dem verwendeten Lysepuffer äquilibriert und anschließend für etwa 30 min bei 4°C mit dem Lysaten auf einem Rotator inkubiert. Danach wurde die Protein A/G Sepharose für 30s bei 3000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 2-5 µg Antikörper für 1 h bis über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit neuen in Lysepuffer äquilibrierten Protein A/G Sepharose für 2 h bei 4°C. Die Menge der eingesetzten Protein A/G Sepharose richtete sich hierbei nach der eingesetzten Proteinmenge. Nach der Inkubationszeit wurde die Protein A/G Sepharose mit einer Tischzentrifuge sedimentiert (30 s, 3000 g, 4°C) und dreimal in Lysepuffer gewaschen (30 s, 3000 g, 4°C). Die Überstände wurden verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde mit Hilfe einer Kapillarspitze möglichst viel von dem Lysepuffer entfernt. Danach wurden das Volumen der Protein A/G Sepharose im gleichen Volumen 2 x SDS Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 95°C und 1000 rpm gekocht. Nach erneuter Sedimentation der Protein A/G Sepharose wurde der Überstand mit einer Kapillarspitze entnommen und entweder in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert oder direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

4.3.3 Aktivitäts-Assays für die GTPasen Rac und Ras

Die Aktivierung der GTPasen Rac und Ras wurde in dieser Arbeit mit den entsprechenden Pull-Down-Aktivitätsassays bestimmt. Das Protoll wurde von Sander *et al.* (1998) übernommen. Die aktiven GTPasen wurden mit Hilfe von GST-fusionierten Bindedomänen aus den Lysaten präzipitiert. Für Rac waren das die AS 69-150 der PAK-1-CRIB Bindedomäne, die ausschließlich an aktives Rac bindet. Ras-GTP wurde mit Hilfe der Ras-bindenden Domäne (RBD) aus Raf präzipitiert, die ebenfalls nur mit der aktiven Form von Ras interagiert. Die COS-7- oder HEK293-Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transient transfiziert und 24 h danach für weitere 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in *GST-Fish-Puffer* lysiert und die Proteinmengen bestimmt. Die verschiedenen Ansätze wurden auf eine einheitliche Proteingesamtkonzentration gebracht und anschließend mit den GST-Fusionsproteinen für 2 h bei 4°C inkubiert. Die Fusionsproteine wurden für jeden Versuch frisch aus Bakterienzellen generiert und für 30 min bei 4°C an Gluthation-Sepharose gekoppelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Lysate abzentrifugiert (30 s, 3000 g, 4°C), die Überstände vorsichtig abgenommen und die Gluthation-Sepharose dreimal mit Lysepuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden in 2 x SDS-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 95°C und 1000 rpm abgekocht. Nach erneuter Sedimentation der Gluthation-Sepharose wurde der Überstand mit einer Kapillarspitze entnommen und entweder in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert oder direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichem Puffersystem durchgeführt (Laemmli *et al.*, 1970). Diese erfolgte in einer vertikalen Gelelektrophorese-Apparatur, in der die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Um optimale Trennungen der Proteine zu erreichen, wurde die Polyacrylamid-Konzentration im Trenngel dem Molekulargewicht der untersuchten Proteine angepasst. Die unten stehende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Trenngele und des, dem Trenngel aufgeschichteten, Sammelgels. Pro Gel wurde am Netzgerät eine Stromstärke von 20 mA angelegt.

Tab. 4.5: Pipettierschema zur Herstellung von Sammel- und Trenngelen verschiedener Konzentrationen.

AA = Acrylamid [30%]; Puffer = Tris-HCl pH 6,8 für Sammelgele und Tris-HCl pH 8,8 für Trenngele

Reagenzien	Sammelgel [10 ml]	Trenngel [10 ml]				
		6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
H₂O	6,8 ml	5,3 ml	4,6 ml	3,9 ml	3,3 ml	2,6 ml
AA	1,7 ml	2 ml	2,7 ml	3,3 ml	4 ml	4,7 ml
Puffer	1,25 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS [10 %]	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
APS [10 %]	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml

4.3.5 Western Blot

Der Transfer geelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran wird als Western-Blot bezeichnet und erlaubt einen spezifischen Nachweis bestimmter Proteine. Auf einer Membran lassen sich die Proteine leicht anfärben oder mit Antikörpern detektieren. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Nitrocellulose-Membranen verwendet.

4.3.5.1 *Semi-Dry-Blot*

Die Proteintransfers wurden standardmäßig mit einer Semi-Dry-Blot-Apparatur der Firma Biometra durchgeführt. Die Handhabung des Geräts erfolgte hierbei nach Angaben des Herstellers. Auf die Anodenplatte wurden zwei in Transferpuffer (siehe 3.4) getränkte Filter-Papiere gelegt. Es folgte die ebenfalls in Transferpuffer getränkte Membran. Nachdem das Gel auf die Membran gebracht wurde, wurden nochmals zwei getränkte Filter-Papiere aufgelegt. Evtl. vorhandene Luftblasen entfernt. Die Kathodenplatte wurde aufgelegt und während des Transfers gekühlt. Es wurde eine Spannung von 5 mA/cm² Gel für eine Dauer von 30 min angelegt.

4.3.5.2 *Wet-Blot*

Für den Protein-Transfer wurde u. a. auch ein Blotting-Tank der Firma Hoefer verwendet. Die Nitrocellulose-Membran, das Filter-Papier und die Kunststoffnetze der Blot-Apparatur wurden vor dem Blotten in Transferpuffer (siehe 3.4) äquilibriert. Auf der Anodenseite der

Haltekassette wurde zunächst das Kunststoffnetz gelegt. Darauf kamen luftblasenfrei zwei Whatman-Papiere und die Membran. Das Protein-Gel wurde vorsichtig und ebenfalls ohne Luftblasen auf die Membran gelegt. Darauf kamen wiederum zwei Whatman-Papiere und mit Hilfe eines Falcon-Röhrchens wurden evtl. vorhandene Luftblasen entfernt. Ein weiteres Kunststoffnetz vervollständigte das Sandwich. Die Haltekassette wurde in den Tank gespannt und dieser mit kaltem Transferpuffer gefüllt. Der Protein-Blot erfolgte für 90 min bei 90 V. Da der Tank an ein Kühlsystem angeschlossen war, wurde so eine Kühlung während des Blotting-Vorgangs gewährleistet.

4.3.6 Ponceau S-Färbung

Nach dem erfolgten Proteintransfer kann die Membran zur Transferkontrolle für ca. 5 min in Ponceau S Lösung inkubiert werden. Sie wurde dann mit dH₂O so lange wieder entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Wurde bei der gelelektrophoretischen Auftrennung kein vorgefärbter Marker verwendet, wurde der Protein-Standard nun ebenfalls sichtbar und mit einem weichen Bleistift nachgezeichnet. Die so gefärbten Membranen wurden anschließend in TBS-T so lange gewaschen, bis die Färbung vollständig verschwunden war.

4.3.7 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Nach dem Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran erfolgte der immunologische Nachweis der Zielproteine selektiv durch Antigen-spezifische Antikörper.

4.3.7.1 ECL Plus Western blotting Detection System

Die Membran wurde in einer geeigneten Blockierlösung für 30-60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in einem 50 ml Röhrchen inkubiert. Hierbei wurden alle unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Danach erfolgte eine Inkubation mit einem proteinspezifischen Primärantikörper für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind unter 3.10 aufgeführt. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TBS/T gewaschen und danach mit einem sekundären Antikörper für weitere 60 min bei RT inkubiert. Die in diesem System verwendeten Sekundärantikörper waren kovalent mit Meerrettich-Peroxidase (HRP = *Horseradish-peroxydase*) gekoppelt. Anschließend wurde die Membran nochmals gewaschen. Die Proteindetektion erfolgte entweder mit der Enhanced Chemilumineszenz Reagenz (ECL™ Plus) von Amersham Biosciences oder einer selbsthergestellten

Lumineszenzreagenz aus drei Komponenten (siehe 3.4). Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert Wasserstoffperoxid. Dabei kommt es zu Chemilumineszenz, die mit Hilfe von *Enhancern* verstärkt wird. Das emittierte Licht erreicht ein Maximum bei 428 nm und kann somit zur Belichtung eines Röntgenfilmes genutzt werden. Die Membranen wurden in eine lichtundurchlässige Filmkassette gelegt und je nach Intensität des Signals entsprechend belichtet. Filme wurden entwickelt und fixiert.

4.3.7.2 ***Odyssey®Infrared Imaging System***

Mit dem Odyssey® Infrared Imaging System kann bei der Antikörperinkubation auf HRP-gekoppelte Antikörper verzichtet werden. Die hier eingesetzten Sekundärantikörper sind direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der mit Hilfe eines Lasers angeregt und detektiert werden kann. Das Odyssey®Infrared Imaging System-Gerät kann emittiertes Licht mit den Wellenlängen 680 nm und 800 nm detektieren. Die Membranen werden in dem Gerät gescannt und anschließend direkt auf einem Computerbildschirm dargestellt. Die Antikörperinkubation vollzieht sich ähnlich wie zuvor beschrieben, allerdings wurde der letzte Waschschrift in TBS vorgenommen, da Tween 20 den Hintergrund erhöht. Der Vorteil dieser Methode ist, dass verschiedene Primärantikörpern, auch wenn sie Proteine gleicher Größe erkennen, gleichzeitig auf die Membran gegeben werden können, soweit sie aus verschiedenen Spezies kommen. Durch die unterschiedlichen Fluoreszenzwellenlängen treten keine Überlagerungen der Signale auf. Ein Strippen und Reinkubieren der Membranen ist in diesem Fall nicht mehr notwendig.

4.3.8 **Entfernen von Antikörpern von einer Membran**

Das Entfernen von Antikörpern von einer Membran wird auch als *Stripping* bezeichnet. Die Antikörper eines vorausgegangenen Experiments von einer Membran entfernt, so dass diese für eine weitere Inkubation mit einem anderen Antikörper wieder verwendet werden kann. Die Membran wurde hierzu für 5 min in *Stripping*-Puffer unter Schütteln inkubiert und anschließend gut mit TBS gewaschen. Sie kann danach erneut blockiert und mit Antikörper inkubiert werden.

4.4 Mikrobiologische Methoden

4.4.1 Anzucht von Bakterien

Die Bakterien wurden entweder von einer LB-Agar-Platte oder aus einer Glycerin-Kultur mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze je nach Bedarf in 5 ml LB-Medium oder 200 ml LB-Medium überführt. Das Medium enthielt dabei ein entsprechendes Antibiotikum in geeigneter Konzentration (siehe 3.12.1). Die Kulturgefäße wurden über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

4.4.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden *E.coli*-Stamm angeimpft und üN bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die üN-Kultur wurde am nächsten Tag 1:5 mit LB-Medium (ohne Antibiotikum) verdünnt und so lange bei 37°C geschüttelt, bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,5 erreicht wurde. Die Kultur wurde dann für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 2000 *g* und 4°C abzentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in 50 ml eiskalter, frisch angesetzter TSS-Lösung resuspendiert und in Aliquots von 400 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C. Die Kompetenz der Zellen wurde mit 1 µg, 10 ng und 100 pg Vektor-DNA getestet (siehe 4.4.3). Um eine Resistenz auszuschließen wurden die Zellen zusätzlich untransformiert auf Amp-Platten ausgestrichen.

4.4.3 Transformation kompetenter Bakterien

Das Einbringen von exogener DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Dafür wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut und anschließend 100 µl davon zusammen mit dem gesamten Ligationsansatz (vgl. 4.1.7) oder ca. 100 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurde der gesamte Ansatz für 30-60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden 2 min bei 5500 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert und 900µl aus dem Überstand wurden abgenommen und verworfen. Die Bakterien wurden in den übrigen 100µl resuspendiert und auf eine LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C über Nacht oder bei Raumtemperatur über mehrere Tage. Die Selektion erfolgte über ein im Plasmid enthaltenes Resistenzgen.

4.4.4 Lagerung von Bakterien

Zur langfristigen Lagerung von rekombinaten Bakterienstämmen werden Glycerolkulturen angelegt. Dazu wurde ein entsprechendes Plasmid in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert und auf LB-Amp-Agar-Platten ausgestrichen. Die gewachsenen Kolonien wurden in 1ml LB-Amp-Medium resuspendiert. 500 µl davon wurden mit 500 µl sterilem Glycerol (100%) in einem sterilen Reaktionsgefäß gemischt. Die Glycerolkulturen wurden bei -80°C gelagert.

4.4.5 Kolonie-PCR

Um positive Klone nach einer Klonierung identifizieren zu können, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Als Template für die PCR dienen die Transformanden auf einer Kulturplatte. Bei erfolgreicher Klonierung liefert die Kolonie-PCR ein Produkt von der Größe des klonierten Fragmentes. Die nach einer Transformation gewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze von der Agar-Platte entnommen und in einem 0.2 ml Reaktionsgefäß abgestreift. Die Pipettenspitze wurde bis zur Identifikation positiver Klone in einem 2 ml Reaktionsgefäß bei 4°C aufbewahrt. Zu dem Klonabstrich im Reaktionsgefäß wurden die entsprechenden Primer, dNTPs, Polymerase und ein entsprechender Puffer zugegeben (siehe Tab. 4.6). Das PCR-Programm wurde individuell je nach zu amplifizierender Sequenz gewählt. Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese analysiert und die positiven Klone identifiziert. Zum Animpfen einer Bakterienkultur für eine Plasmid-Mini-Präparation wurden die Pipettenspitzen dieser Klone in 5 ml LB-Amp-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Tab. 4.6: Pipettierschema für eine Kolonie-PCR.

Reagenzien	Volumen [µl]
sense-Primer [10 pmol/µl]	1
antisense-Primer [10 pmol/µl]	1
dNTPs [10mM]	0,5
10 x PCR Puffer	2,5
<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/µl]	0,2
dH ₂ O	ad 25

4.4.6 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte mittels kommerziell erhältlicher Kitsysteme. Je nach Verwendungszweck der isolierten Plasmid-DNA wurden geringe DNA-Mengen mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert. Größere DNA-Mengen, sowie DNA höherer Reinheit (z.B. für Transfektionen) wurden mit dem QIAprep Plasmid Maxi Kit (Qiagen) isoliert. Für die Isolierung kleiner Plasmidmengen mittels Miniprep Kit bzw. größerer Plasmid-Mengen mittels Maxi Kit erfolgte nach Angaben des Herstellers aus einer 5 ml Bakterienkultur für ein Miniprep bzw. aus einer 200 ml Bakterienkultur für ein Maxiprep, die jeweils über Nacht bei 37°C schüttelnd kultiviert wurde.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung der Interaktion von Tiam1 und Vinexin- β

In Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeiten konnte mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Screens gezeigt werden, dass Vinexin- β ein neuer Interaktionspartner von Tiam1 ist, der innerhalb der N-terminalen 853 Aminosäuren von Tiam1 bindet (Engers *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Interaktion mit dem N-Terminus konnte als spezifisch gewertet werden, da in Kontrollexperimenten weder mit dem Kontrollplasmid noch mit den C-terminalen 580 Aminosäuren von Tiam1 eine Bindung detektiert werden konnte.

5.1.1 Nachweis der Bindungsspezifität von Tiam1 und Vinexin- β

5.1.1.1 Co-Lokalisation von Tiam1 und Vinexin- β in BA-HAN-1C-Zellen

Tiam1 wird im Rahmen seiner Aktivierung an die Zellmembran transloziert und induziert dort mit dem sog. *membrane ruffling* eine morphologische Veränderung der Zellmembran (Michiels *et al.*, 1995). Um die Bedeutung der Tiam1-Vinexin- β -Interaktion näher zu analysieren wurde zunächst, und bereits in Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit, untersucht, ob beide Proteine in der Zelle co-lokalisieren und welche funktionelle Relevanz sich daraus für die Zellmorphologie ergibt. Dazu wurden BA-HAN-1C-Zellen mit Hilfe von Lipofectamin transient mit den entsprechenden Plasmiden für Tiam1 und/oder Vinexin- β transfiziert bzw. co-transfiziert und anschließend mittels konfokalen Lasermikroskops analysiert. Diese Zellen wurden für die Immunfluoreszenzuntersuchungen ausgewählt, weil sie im Gegensatz zu z. B. COS-7-Zellen kein endogenes *membrane ruffling* zeigen. Veränderungen des Phänotyps der Zelle konnten so auf die Überexpression der transfizierten Konstrukte zurück geführt werden. Die Abb. 5.1 A zeigt die Lokalisation von Vinexin- β im Cytoplasma der Zelle. Der Fibroblastenartige-Phänotyp der Zelle wird durch Vinexin- β nicht verändert. Im Gegensatz dazu ist Tiam1 sowohl im Cytoplasma der Zelle, als auch an der Zellmembran lokalisiert, wo es das bereits erwähnte *membrane ruffling* und einen „pfannkuchenähnlichen“ Phänotyp der Zelle induziert (Abb. 5.1 B). Eine Co-Transfection von Tiam1 und Vinexin- β zeigt eine Co-Lokalisation beider Proteine im Cytoplasma und an den Tiam1-induzierten Membrankräuselungen (engl. *membrane ruffles*) der Zellmembran (Abb. 5.1 C). Die

Ergebnisse zeigen klar, dass in Zellen eine Interaktion beider Proteine aufgrund ihrer Lokalisation möglich ist, Vinexin- β aber keinen Einfluss auf den von Tiam1 induzierten Phänotyp der Zelle hat.

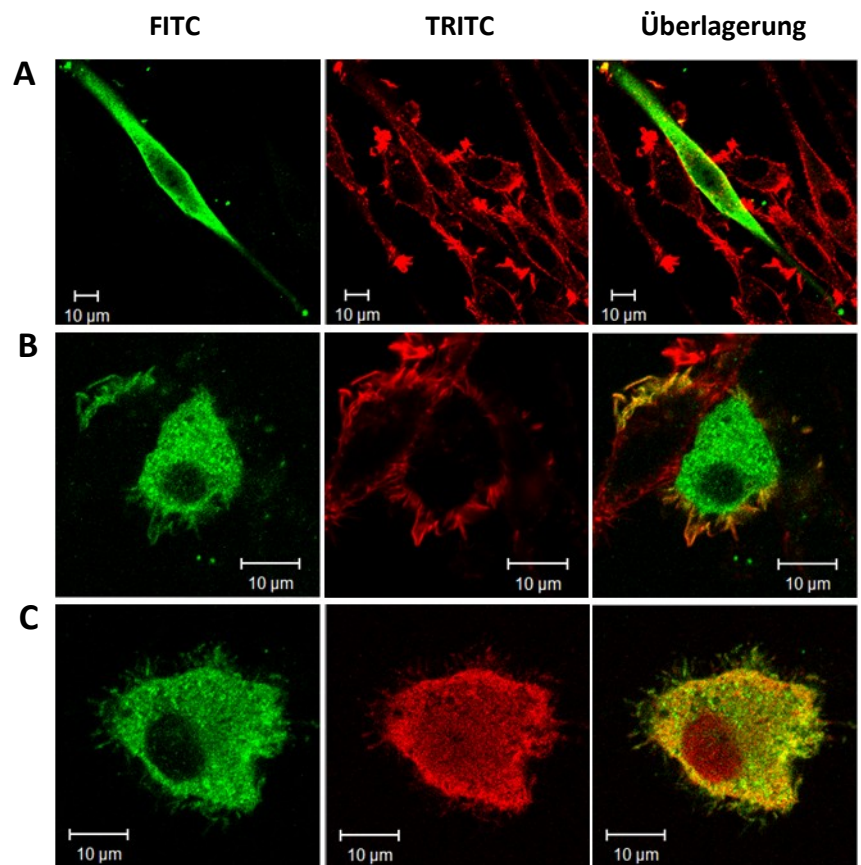


Abb. 5.1: Immunfluoreszenzaufnahmen von Vinexin- β und Tiam1 in BA-HAN-1C-Zellen. BA-HAN-1C-Zellen wurden mit Vinexin- β und Tiam1 jeweils alleine und in Kombination transfiziert, 48 h später mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit Vinexin- β - bzw. Tiam1-spezifischen Antikörpern und den entsprechenden FITC- bzw. TRITC-markierten Antikörpern gefärbt. (A) Vinexin- β -transfizierte Zelle. Vinexin- β erscheint durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper grün, das Actin-Cytoskelett durch TRITC-markiertes Phalloidin rot. (B) Tiam1-transfizierte BA-HAN-1C-Zelle. Tiam1 fluoresziert grün, Actin rot, Überlagerungen durch die Co-Lokalisation von Tiam1 mit dem Cytoskelett erscheinen gelb. (C) BA-HAN-1C-Zelle nach Co-Transfektion von Tiam1 (grün) und Vinexin- β (rot). Die Überlagerungen von Tiam1 und Vinexin- β im Bereich der Zellmembran erscheinen gelb.

5.1.1.2 *Co-Immunopräzipitation von Tiam1 und Vinexin- β*

Für den Nachweis der Tiam1-Vinexin- β -Interaktion *in vitro* wurden Co-Immunopräzipitationsexperimente (Co-IP) durchgeführt. Dafür wurden COS-7-Zellen mit HA-FL-Tiam und Vinexin- β co-transfiziert. COS-7-Zellen eignen sich aufgrund ihrer hohen Transfektionseffizienz besonders gut für sich daran anschließende Untersuchungen. Die transfizierten Konstrukte befanden sich bereits in einem pMT2SM-Expressionsvektor. Zur

Kontrolle wurde ein HA-getaggtter pMT2SM-Expressionsvektor (Leervektor) zusammen mit Myc-Vinexin- β transfiziert um auszuschließen, dass eine unspezifische Bindung auftritt. Die Transfektion der COS-7-Zellen erfolgte wie beschrieben nach der DEAE-Dextran-Methode (siehe 4.2.2.1). 48-72 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Lysepuffer V lysiert. Der Erfolg der Transfektion für Tiam1 und Vinexin- β wurde aus diesen Lysaten in einer SDS-PAGE und anschließend Immunoblot überprüft. Für die Co-IP wurden 1500 μ g Protein aus den Lysaten eingesetzt und für 2 h rotierend mit 2 μ g anti-HA-Antikörper [0,2 μ g/ μ l] inkubiert, um HA-Tiam1 zu isolieren. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ l A-Sepharose für nochmals 2 h. Der Präzipitationserfolg für Tiam1 wurde ebenfalls im Western Blot überprüft. Co-immunopräzipitiertes Vinexin- β wurde in einem zusätzlichen Western Blot nachgewiesen.

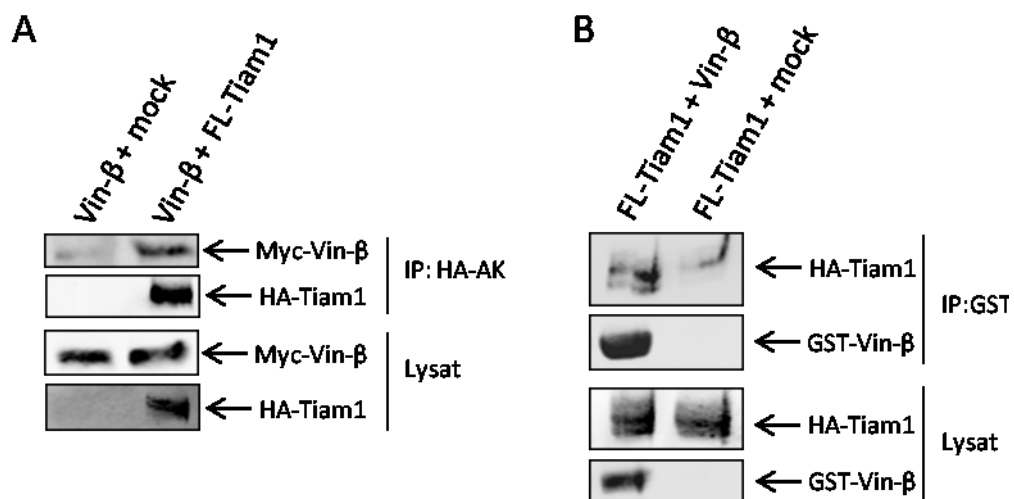


Abb. 5.2: Immunologischer Nachweis von Vinexin- β und Tiam1. (A) Myc-Vinexin- β wurde zusammen mit HA-FL-Tiam1 oder einem HA-Leervektor transient in COS-7-Zellen transfiziert (Lysat). Tiam1 wurde aus den Lysaten bzw. nach der Co-Immunopräzipitation über eine 8 %-ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Tiam1-Antikörper (C16-Antikörper) und sekundären HRP-Antikörper detektiert. Zur Detektion von Myc-Vinexin- β wurden die Lysate in einer 12% igen SDS-PAGE aufgetrennt und Vinexin- β mit einem Myc-Antikörper und sekundärem HRP-Antikörper detektiert. (B) HA-FL-Tiam1 wurde zusammen mit GST-Vinexin- β bzw. einem GST-Leervektor in COS-7-Zellen co-transfiziert (Lysat). Nach der Co-Präzipitation und zur Überprüfung der Transfektion wurde Tiam1 über eine 8 %-ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Tiam1-Antikörper (C16-Antikörper) detektiert. Die Auftrennung von GST-Vinexin- β erfolgte über eine 12 %-ige SDS-PAGE und anschließender Detektion durch einen GST-Antikörper (mock = Leervektor; FL = Full Length).

Die Ergebnisse der Abb. 5.2 A zeigen deutlich, dass Vinexin- β mit HA-getaggttem FL-Tiam1 co-immunopräzipitiert wurde und somit spezifisch an Tiam1 bindet. Es zeigte sich keine unspezifische Bindung von Vinexin- β an den HA-pMT2SM-Leervektor.

Zur Überprüfung der erzielten Ergebnisse wurde die Präzipitationsexperimente auch in umgekehrter Art und Weise durchgeführt. Dazu wurden GST-getaggttes Vinexin- β bzw. ein GST-Leervektor zusammen mit HA-FL-Tiam1 in COS-7-Zellen co-transfiziert und die Zellen nach 48-72 h lysiert. Die Präzipitation von Vinexin- β erfolgte mit Hilfe von *GST-Sepharose* für 2 h. Nachdem der Präzipitationserfolg von GST-Vinexin- β im Western Blot überprüft wurde, wurde die Co-Präzipitation von Tiam1 an Vinexin- β in einem zusätzlichen Immunoblot untersucht (Abb. 5.2 B). Auch hier zeigt sich deutlich eine spezifische Bindung von Tiam1 an Vinexin- β . Die Tatsache, dass auch etwas Tiam1 in der Kontrolle co-präzipitiert wurde, ist vermutlich auf wenig stringente Waschschrirte und /oder eine unspezifische Bindung von Tiam1 an die *GST-Sepharose* zurückzuführen. Das im Immunoblot detektierte Signal war als Hintergrund zu werten und muss somit bei der Auswertung von dem anderen Signal abgezogen werden.

5.1.2 Charakterisierung der Tiam1-Vinexin- β -Interaktion

Nachdem die spezifische Bindung von Vinexin- β an Tiam1 sowohl im Y2H als auch auf biochemischer Ebene verifiziert wurde, sollte weiterhin die für die Bindung verantwortliche Tiam1-Domäne identifiziert werden. Dafür wurden verschiedene Tiam1-Deletionsmutanten verwendet (Abb. 5.3) und zusammen mit Vinexin- β in BA-HAN-1C-Zellen co-transfiziert, bevor die Zellen nach immunocytochemischer Anfärbung im konfokalen Lasermikroskop analysiert wurden. Ein FL-Tiam1-Konstrukt und das im Y2H benutzte N853-Tiam1 wurden als interne Positivkontrollen eingesetzt. N853-Tiam1 wurde in den Vorarbeiten zu der vorliegenden Dissertation für den Y2H ausgewählt, da dieses Konstrukt den für die Regulation der Proteinaktivität essentiellen N-Terminus und die PHn-CC-Ex-Domäne beinhaltet. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden als Negativkontrollen ein HA-Leervektor und C580-Tiam1 verwendet. Dieses Konstrukt zeigte im Y2H keine Bindung an Vinexin- β und sollte damit nicht an einer Interaktion zwischen Tiam1 und Vinexin- β beteiligt sein (Engers *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Daher sollte C580-Tiam1 auch in Zellen keine Co-Lokalisation mit Vinexin- β erkennen lassen. Alle verwendeten Tiam1-Konstrukte wurden bereits in einen pMT2SM-Expressionsvektor kloniert und N-oder C-terminal mit einem HA-Tag versehen, um die Proteine immunologisch nachweisen und von dem endogenen Tiam1 unterscheiden zu können.

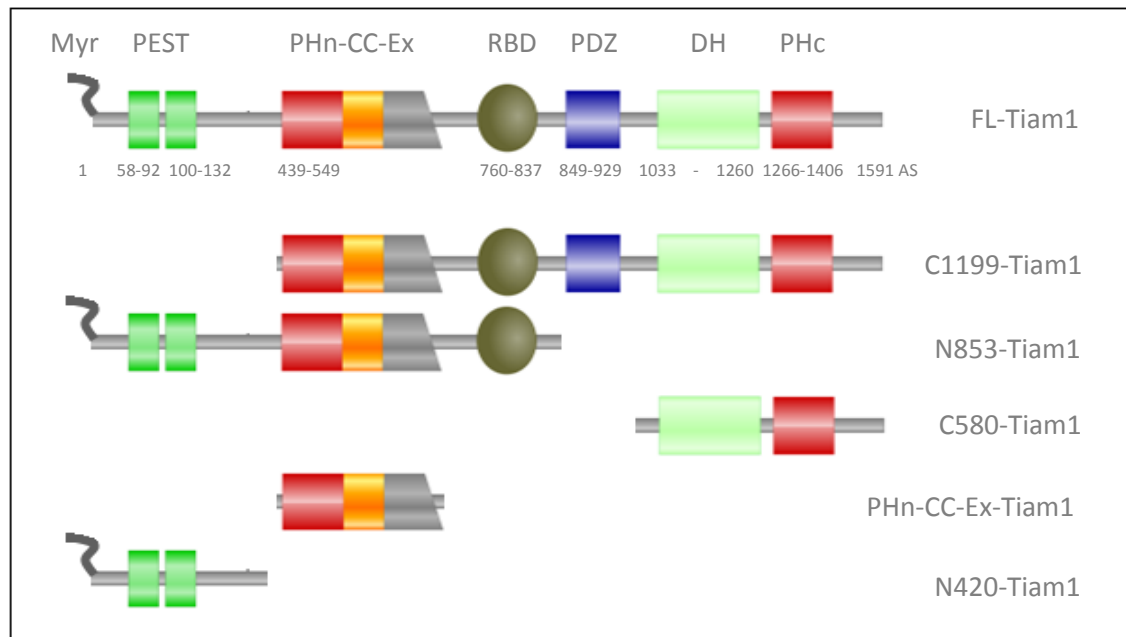


Abb. 5.3: Schematische Darstellung der verwendeten Tiam1-Deletionsmutanten. Jedes der Konstrukte besitzt einen HA-Tag am N- oder C-Terminus, um die Proteine immunologisch nachweisen bzw. von endogenem Tiam1 unterscheiden zu können. Die angegebene Zahl vor den jeweiligen Deletionsmutanten bezieht sich auf die Anzahl der C- oder N-terminalen Aminosäuren. (FL: Full length Tiam1, Myr: Myristoylierungsstelle, PHn: NH_2 -terminale Pleckstrin-homologe-Domäne, CC: Coiled-Coil-Region, Ex: extended structure, RBD: Ras- Binde-Domäne, PDZ: PSD-95/Dgla/ZO-1-Domäne, DH: Dbl-homologe Domäne, PHc: COOH-terminale Pleckstrin-Homologe-Domäne).

Für die Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden abermals BA-HAN-1C-Zellen transient mit Vinexin- β und den zur Verfügung stehenden HA-getaggten Tiam1-Deletionsmutanten co-transfiziert und im Anschluß daran mittels konfokalen Fluoreszenzmikroskops untersucht. Zur Kontrolle wurde ein HA-getaggter leerer Vektor zusammen mit Vinexin- β co-transfiziert. Dabei sollte nicht nur überprüft werden, ob beide Proteine in der Zelle eine Co-Lokalisation zeigen, sondern auch in welchem Zellkompartiment sich diese befinden. Zudem sollte untersucht werden ob und – wenn ja – durch welche Co-Transfektion von Vinexin- β mit einer der Tiam-Deletionsmutanten der charakteristische Tiam1-induzierte Phänotyp mit ausgeprägtem *membrane ruffling* und cytoplasmatischer Vesikelbildung in morphologisch fassbarer Form modifiziert wird. In Abb. 5.7 sind die Aufnahmen der FITC- und TRITC-vermittelten Fluoreszenzen für Vinexin- β und Tiam1 sowie die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale dargestellt. Die Co-Transfektion von Vinexin- β mit dem leeren Vektor (*mock*) wurde als Kontrolle durchgeführt und zeigte eine diffuse Verteilung beider Proteine im Cytoplasma der Zelle. Die Überlagerung war als Hintergrund zu werten. Auch hier wurde kein möglicher Einfluss von Vinexin- β auf den spindelartigen Phänotyp der Zelle sichtbar. Die Co-Transfektion von Vinexin- β mit FL-Tiam resultierte in einer Co-Lokalisation beider

Proteine im Cytoplasma und an den *membrane ruffles*. FL-Tiam1 induzierte außerdem wie erwartet einen „pfannkuchenartigen“ Phänotyp der transfizierten Zelle, der von Vinexin-β in keiner Weise beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse belegen nochmals, dass eine Interaktion von Vinexin-β und Tiam1 in Zellen möglich ist und dass Vinexin-β keinerlei Einfluss auf den Tiam1-induzierten Phänotypen der Zelle hat. Auch die konstitutiv aktive C1199-Tiam1-Deletionsmutante induzierte – obwohl relativ schwach exprimiert – den typischen „pfannkuchenartigen“ Phänotypen der Zelle, *membrane ruffling* und starke Vesikelbildung im Cytoplasma der Zelle. Eine Co-Lokalisation mit Vinexin-β ergab sich für C1199-Tiam1 vor allem im Bereich der Zellmembran und der Vesikel im Cytoplasma. Vinexin-β hatte auch hier keinen Einfluss auf den Tiam1-induzierten Phänotypen der Zellen. Bei der Co-Transfektion von Vinexin-β zusammen mit N853-Tiam1 wurde im Mikroskop jedoch wieder ein eher spindelartiger Phänotyp der Zelle sichtbar. Vinexin-β bewirkte bisher keinerlei morphologische Veränderung in den Zellen und auch N853-Tiam1 hatte keinen Einfluss auf den spindelartigen Phänotyp der Zelle. Obwohl auch die N853-Deletionsmutante von Tiam1 die, für die Membranlokalisierung und das nachfolgende *membrane ruffling* wichtige, PHn-CC-Ex-Domäne besitzt, zeigten die Immunfluoreszenzaufnahmen der mit Vinexin-β und N853-Tiam1 transfizierten Zellen zudem weder *membrane ruffling* noch cytoplasmatische Vesikelbildung. Eine Co-Lokalisation und somit Interaktion von Vinexin-β mit N853-Tiam1 war jedoch im Bereich der Zellmembran zu erkennen. C580-Tiam1 und Vinexin-β zeigten, ähnlich wie der Leervektor und Vinexin-β, eine diffuse Verteilung beider Proteine im Cytoplasma. Eine Co-Lokalisation konnte hier jedoch nicht gezeigt werden. Der Phänotyp der mit C580-Tiam1 transfizierten Zelle war weder spindelförmig noch „pfannkuchenartig“ abgerundet, sondern erschien in einer „Mischform“. Zudem konnten durch C580-Tiam1 keine Vesikelbildung im Cytoplasma der Zellen oder *membrane ruffling* induziert werden.

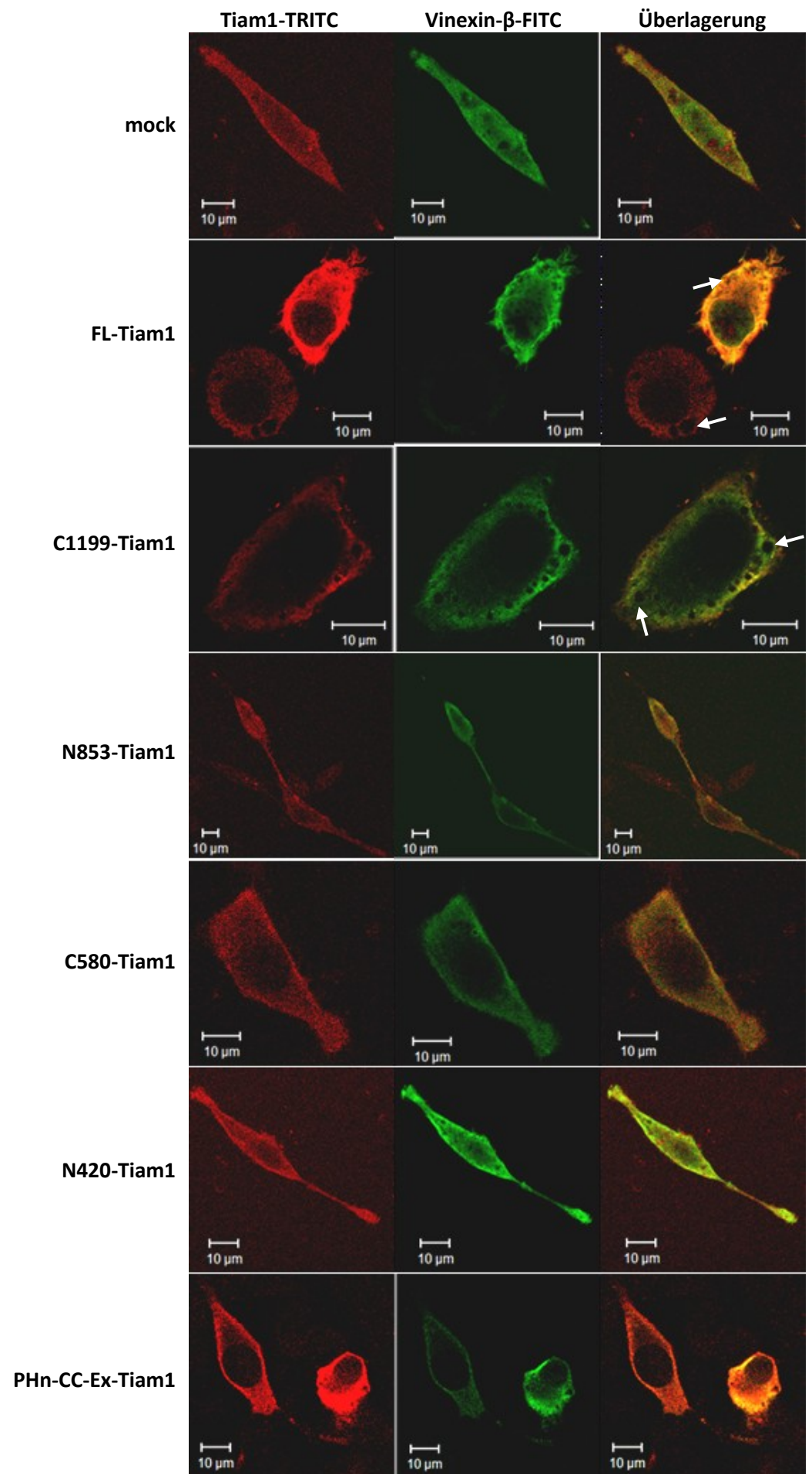


Abb. 5.4: Intrazelluläre Co-Lokalisation von Vinexin-β und verschiedenen Tiam1-Deletionsmutanten. Immunfluoreszenzaufnahmen von BA-HAN-1C-Zellen nach transienter Transfektion mit Vinexin-β und verschiedenen Tiam1-Deletionsmutanten. Das transfizierte Vinexin-β-Konstrukt verfügt über einen Myc-Tag und wurde daher mit einem Myc-Antikörper und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Die unterschiedlichen Tiam1-Konstrukte sind mit einem HA-Tag versehen und konnten so durch einen HA-Antikörper und einen TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt werden. Überlagerungen von grün (FITC) und rot (TRITC) sind in gelb dargestellt. Die Pfeile demonstrieren exemplarisch die für Tiam1 charakteristische Vesikelbildung im Cytoplasma der Zellen.

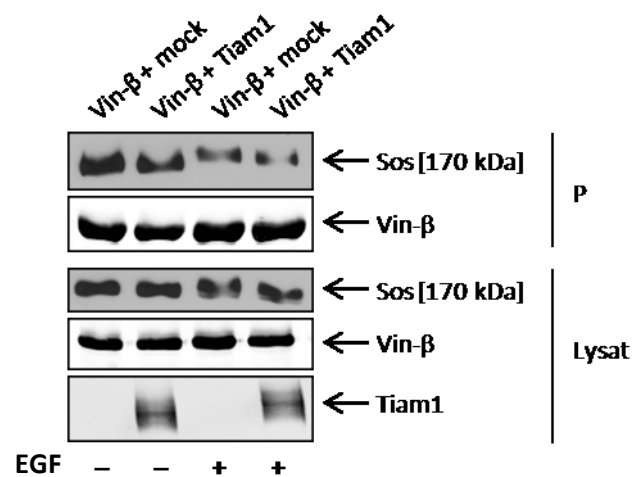
In einem weiteren Ansatz wurde Vinexin-β zusammen mit der N420-Tiam1-Deletionsmutante co-transfiziert. Die Expression beider Proteine hatte keinen Einfluss auf die Spindelform der Zellen. Auch konnten weder *ruffling* der Zellmembran noch Vesikelbildung im Cytoplasma nachgewiesen werden. Die starke Expression beider Proteine machte eine Interpretation über eine Co-Lokalisation in der Zelle schwierig. Die Immunfluoreszenzaufnahmen deuten jedoch darauf hin, dass Vinexin-β mit N420-Tiam1 sowohl im Cytoplasma als auch an der Zellmembran lokalisiert ist. Eine Co-Lokalisation mit Vinexin-β ergab sich außerdem nach Co-Transfektion mit der PHn-CC-Ex-Domäne von Tiam1. Diese war teils an der Zellmembran und teils im Cytoplasma der Zelle lokalisiert. Die Untersuchung der transfizierten BA-HAN-1C-Zellen ergab, dass es tatsächlich Unterschiede zwischen den verschiedenen Tiam1-Deletionsmutanten bezüglich ihrer Lokalisation in der Zelle gab. Außerdem wurden das *membrane ruffling* und cytoplasmatische Vesikelbildung nur von FL- und C1199-Tiam hervorgerufen, also nur durch Konstrukte, die die PHn-CC-Ex-Domäne besitzen. Die N853-Tiam1-Deletionsmutante induzierte allerdings kein *membrane ruffling*. Auch die Expression des Proteins war schwach. Vermutlich wird das Protein im Gegensatz zu C1199-Tiam schneller durch Proteasen abgebaut. Die PHn-CC-Ex-Domäne alleine reichte nicht aus, um ein *ruffling* der Zellmembran zu induzieren.

5.1.3 Einfluss von Tiam1 und EGF auf die Interaktion von Vinexin-β mit Sos bzw. Vinexin-β und ERK1,2

Die Aktivierung von Sos, Ras und ERK 1, 2 durch den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) führt bereits nach fünf Minuten zu einer Dissoziation der Bindung zwischen Vinexin-β und dem Ras-/Rac-Aktivator Sos (Akamatsu *et al.*, 1999). Gleichzeitig kommt es zu einer gesteigerten Bindung zwischen Vinexin-β und aktivem ERK 1,2 (Mitsushima *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss von Tiam1 auf diese Prozesse untersucht werden. Dazu wurden HA-FL-Tiam1 und GST-Vinexin-β in einem Doppelansatz in COS-7-Zellen transient überexprimiert. Im Anschluß an die Co-Transfektion wurden die Zellen

einem 24-stündigen Serumentzug unterworfen bevor einer der transfizierten Ansätze für fünf Minuten mit EGF [100 ng/ml] stimuliert wurde. Der zweite Ansatz blieb zur Kontrolle unstimuliert. Anschließend wurde das GST-Vinexin- β mit Hilfe von GST-*Sepharose* aus den Lysaten präzipitiert. In den folgenden Western Blots für Vinexin- β , Sos und ERK 1, 2 wurde dann untersucht, welchen Einfluss Tiam1 auf die Interaktion von Vinexin- β mit Sos bzw. Vinexin- β mit ERK 1, 2 hat. Zur Beurteilung der jeweiligen Expressionniveaus wurden sowohl für FL-Tiam1 und Vinexin- β als auch für Sos und ERK 1, 2 Western Blot-Analysen aus den totalen Zelllysaten durchgeführt. Darüber hinaus wurde als Kontrolle für eine erfolgreiche EGF-Stimulation die Aktivität von Sos und ERK 1, 2 mit den entsprechenden Antikörpern im Western Blot im Vergleich zu den unstimulierten Zellen überprüft.

Abb. 5.5: Einfluss von Tiam1 und EGF auf die Bindung von Sos und Vinexin- β in COS-7-Zellen. GST-Vinexin- β wurde mit HA-Tiam1 bzw. einem HA-Leervektor co-transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 5 min mit EGF [100 ng/ml] stimuliert. Co-Präzipitation von Sos mit GST-Vinexin- β erfolgte an Glutathione-Sepharose. Der immunologische Nachweis der präzipitierten Proteine (P) erfolgte mit anti-Sos- bzw. anti-GST-Antikörper. Die Expression der Proteine aus dem Lysat wurde im Immunoblot mit Sos-, GST- und für FL-Tiam1 mit einem HA-Antikörper nachgewiesen. Die Abbildung ist repräsentativ für n = 4 Versuche.

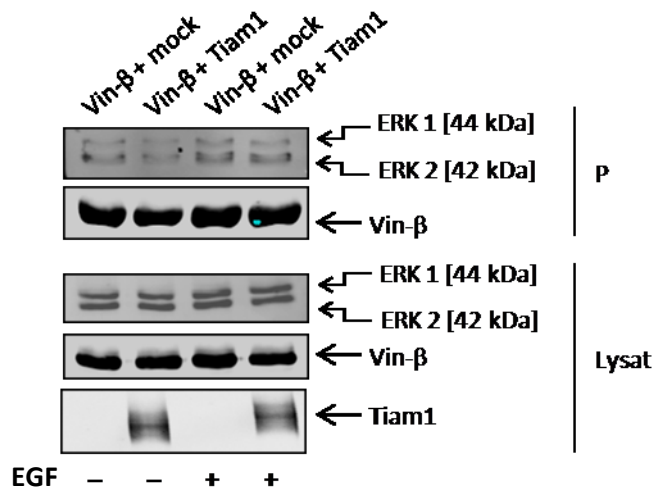


Wie erwartet, führte die Stimulation der COS-7-Zellen mit EGF zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von Sos, die sich im Western Blot anhand der Bandenverschiebung nachweisen ließ. Die Sos-Aktivierung resultierte in einer partiellen Dissoziation von Vinexin- β und Sos (Abb. 5.5). Zusätzlich zeigt der Western Blot für co-präzipitiertes Sos, dass Sos auch in Anwesenheit von FL-Tiam1 teilweise aus der Bindung mit Vinexin- β dissoziiert. Dieser Einfluss von FL-Tiam1 auf die Vinexin- β -Sos-Interaktion zeigte sich dabei unabhängig von der Behandlung mit EGF.

Aus demselben Versuchsansatz wurden Co-Präzipitationsversuche für ERK durchgeführt. Die durchgeführten Experimente zeigten deutlich, dass die Stimulation mit EGF die Co-Präzipitation von ERK mit Vinexin- β im Vergleich zu dem unstimulierten Ansatz steigerte (Abb. 5.6). Allerdings blieb der Effekt von Tiam1 auf die Vinexin- β -ERK-Interaktion unklar.

Tiam1 hatte in den durchgeführten Versuchen teils einen inhibierenden und teils einen stimulierenden Effekt auf die Vinexin- β -ERK-Interaktion, so dass hier leider keine präzise Aussage getroffen werden konnte. Die Abb. 5.6 kann für diesen Aspekt daher nicht allgemeingültig interpretiert werden.

Abb. 5.6: Einfluss von Tiam1 und EGF auf die Bindung von ERK und Vinexin- β in COS-7-Zellen. GST-Vinexin- β wurde mit HA-Tiam1 bzw. einem HA-Leervektor co-transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 5 min mit EGF [100 ng/ml] stimuliert. Co-Präzipitation von ERK mit GST-Vinexin- β erfolgte an Glutathione-Sepharose. Der immunologische Nachweis der präzipitierten Proteine (P) erfolgte mit ERK- bzw. GST-Antikörper. Die Expression der Proteine aus dem Lysat wurde im Immunoblot mit ERK-, GST- und für FL-Tiam1 mit HA-Antikörper nachgewiesen. Die Abbildung repräsentativ für 4 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.



5.1.4 Einfluss von EGF auf die Tiam1-Vinexin- β -Interaktion

Durch die EGF-induzierte Aktivierung von Sos und Ras wird Vinexin- β aus der Vinexin- β -Sos-Interaktion freigesetzt. Der GEF Tiam1 bindet bevorzugt an aktives und kaum an inaktives Ras (Lambert *et al.*, 2002). Um zu untersuchen welche Auswirkung die Stimulation durch EGF, und damit die Aktivierung von Ras auf die Bindung zwischen FL-Tiam1 und Vinexin- β hat, wurden COS-7-Zellen mit FL-Tiam1 und Vinexin- β in einem Doppelansatz transient co-transfiziert und anschließend Bindungsanalysen durchgeführt. Nach einem Serumentzug für 24 h wurde einer der transfizierten Ansätze für 5 min mit EGF [100 ng/ml] stimuliert, während der andere Ansatz zur Kontrolle unstimuliert blieb. Die Stimulationsbedingungen wurden anhand der Ergebnisse von Elad-Sfadia *et al.*, (2002) ausgewählt, die zeigen konnten, dass sie in COS-7-Zellen zu einer deutlichen Aktivierung von Ras führen. Danach wurden entweder HA-FL-Tiam1 oder GST- Vinexin- β aus dem Lysat immuno-/präzipitiert. In den anschließenden Western Blot-Analysen wurde überprüft, ob die Präzipitation gelungen ist und wieviel Vinexin- β bzw. FL-Tiam1 unter den jeweiligen Versuchsbedingungen co-präzipitiert werden konnte. Zusätzlich wurde der Erfolg der Transfektion für Tiam1 und Vinexin- β in Western Blots analysiert.

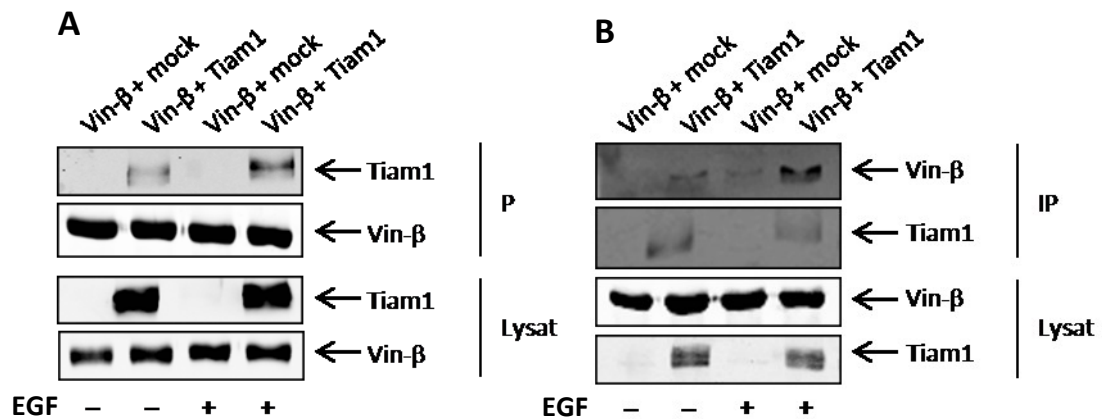


Abb. 5.7: Einfluss von EGF auf die Tiam1-Vinexin-β-Interaktion. Vinexin-β wurde zusammen mit Tiam1 bzw. einem Leervektor in Cos-7-Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 5 min mit EGF stimuliert. (A) Die Co-Präzipitation von Tiam1 an GST-Vinexin-β erfolgte über GST-Sepharose. Die Detektion der präzipitierten Proteine (P) erfolgte mit HA-Antikörper für Tiam1 bzw. GST-Antikörper für Vinexin-β. Die Expression der Proteine im Lysat wurden ebenfalls mit anti-HA- bzw. anti-GST-Antikörper nachgewiesen. (B) Co-Präzipitation von Vinexin-β an Tiam1 mittels HA-Antikörper und ProteinA-Sepharose. Die Detektion der immunpräzipitierten Proteine (IP) erfolgte mit HA-Antikörper für Tiam1 bzw. Myc-Antikörper für Vinexin-β. Die Expression der Proteine im Lysat wurden ebenfalls mit HA- bzw. Myc-Antikörper nachgewiesen. Die Abbildung ist repräsentativ für jeweils n= 4 Versuche.

Im ersten Versuchsansatz (Abb. 5.7 A) wurde FL-Tiam1 mit GST-getagtem Vinexin-β co-präzipitiert. Die Western Blot-Analysen für diesen Versuch zeigen, dass Tiam1 nach EGF-Stimulation eine deutlich höhere Bindungsaffinität für Vinexin-β hat als in der unstimulierten Kontrolle.

Für die Co-Präzipitation beider Proteine in umkehrter Art und Weise wurde HA-getaggtes FL-Tiam1 mit Hilfe eines HA-Antikörpers und A-Sepharose aus dem Lysat immunopräzipitiert. Die Ergebnisse der Abb. 5.7 B zeigen erneut, dass die EGF-Stimulation die Bindung von Vinexin-β an Tiam1 deutlich steigert. Zudem wurde hier noch einmal die Spezifität der Vinexin-β-Tiam1-Bindung verdeutlicht, da Vinexin-β nicht mit dem leeren HA-pMT2SM-Vektor co-immunopräzipitiert werden konnte. Die Bindungsanalysen zwischen Vinexin-β und Tiam1 wurden zusätzlich in HEK293-Zellen untersucht. Durch ihr sehr gutes Wachstumsverhalten lassen sich Protein-Protein-Interaktionen nach Transfektionsexperimenten gut untersuchen, da große Mengen an Protein gewonnen werden können.

5.1.5 Einfluss von Vinexin-β auf die Tiam1-Ras-Interaktion

Vinexin-β dissoziiert nach EGF-Stimulation aus der Bindung mit dem Ras/Rac GEF Sos. Diese in der Literatur beschriebenen Ereignisse von Akamatsu *et al.* (1999) konnten im Rahmen dieser Arbeit durch eigene Versuche in COS-7-Zellen bestätigt werden (siehe 5.1.4). Zudem

konnte ebenfalls in COS-7-Zellen gezeigt werden, dass Vinexin- β nach Stimulation des EGF-Rezeptors eine gesteigerte Bindungsaffinität für Tiam1 zeigt (siehe 5.1.5). Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht, ob Vinexin- β durch die EGF-stimulierte, gesteigerte Bindung an Tiam1 die Interaktion zwischen Tiam1 und aktivem Ras in irgendeiner Weise beeinflussen könnte. Denkbar waren hier zwei verschiedene Ansätze: zum einen könnte Vinexin- β die Interaktion zwischen Tiam1 und Ras kompetitiv hemmen. Zum anderen wäre durch die Tiam1-Vinexin- β -Interaktion eine bindingsinduzierte Konformationsänderung für Tiam1 denkbar, die eine Interaktion mit Ras unterstützen könnte. Um nun den Einfluss von Vinexin- β auf die Bindung zwischen Tiam1 und aktivem Ras zu untersuchen, wurde FL-Tiam1 entweder alleine oder in Kombination mit Vinexin- β in COS-7- und HEK293-Zellen überexprimiert. Analog zu den in 5.1.3 und 5.1.4 beschriebenen Experimenten wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion für weitere 24 h einem Serumentzug unterworfen und anschließend für fünf min mit EGF [100 ng/ml] stimuliert. Diese Stimulation sollte zu einer Aktivierung von Ras führen (Elad-Sfadia *et al.*, 2002). Die erfolgreiche Transfektion der transient transfizierten Konstrukte wurde in Western Blot-Analysen aus den totalen Lysaten überprüft. Die Aktivierung von Ras wurde durch ein Ras-spezifisches Aktivitätsassay untersucht. Hierbei wurde aktives Ras mit Hilfe der GST-gekoppelten Ras-Bindedomäne (GST-RBD) aus Raf eingesetzt. In den folgenden Immunoblots wurde die erfolgreiche Präzipitation von Ras untersucht. Außerdem wurde die Co-Präzipitation von Tiam1 an Ras unter den jeweiligen Versuchsbedingungen analysiert.

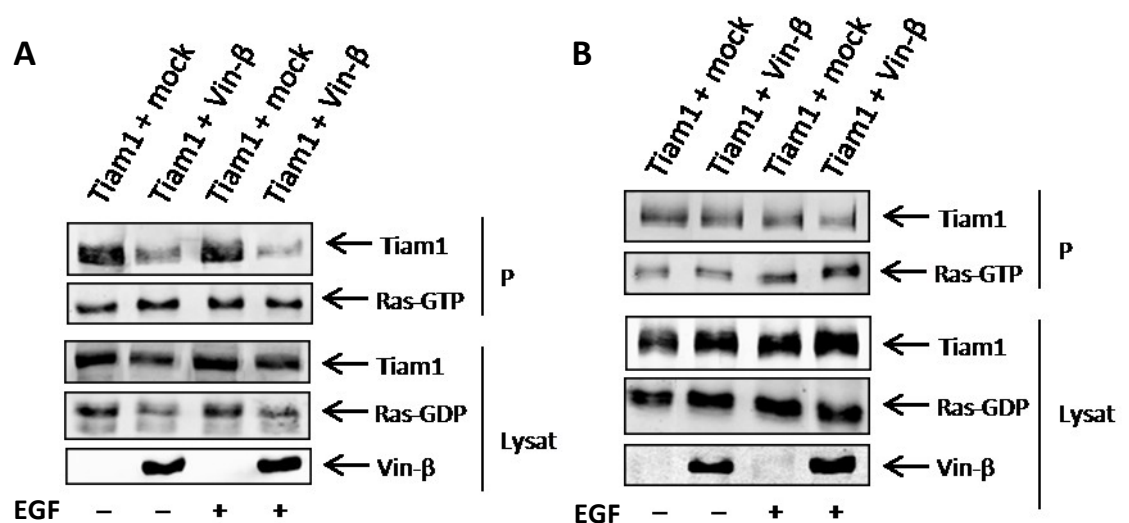


Abb. 5.8: Effekt von Vinexin- β und EGF-Stimulation auf die Interaktion von Tiam1 mit Ras-GTP. Die Versuche erfolgten in COS-7-Zellen (A) und in HEK293-Zellen (B). Co-Präzipitation von Tiam1 an aktives Ras erfolgte über

die Ras-Bindedomäne aus der Raf-Kinase an GST-Sepharose. Die Detektion der präzipitierten Proteine (P) Proteine und der Proteine im totalen Zelllysate erfolgte mit anti-C16-Tiam1-, anti-Ras- und für Myc-getaggtetes Vinexin- β mit anti-Myc-Antikörper. Die Behandlung mit EGF [100 ng/ml] erfolgte für 5 min bei 37°C. Die Abbildung ist repräsentativ für n = 3 Versuche (B).

Der Ras-Aktivitätsassay (Abb. 5.8) zeigte, dass die EGF-Stimulation alleine keinen Effekt auf die Interaktion zwischen Tiam1 und aktivem Ras hat. Dies konnte sowohl in COS-7-Zellen, als auch in HEK293-Zellen gezeigt werden. Vinexin- β hatte allerdings in den unterschiedlichen Zellsystemen verschiedene Effekte auf das Bindungsverhalten von Tiam1 an aktives Ras. In COS-7-Zellen konnte gezeigt werden, dass Vinexin- β die Tiam1-Ras-Interaktion beeinflusste, indem die Bindung der Proteine deutlich gehemmt wurde (Abb. 5.8 A). Diese Hemmung wurde in dem durchgeführten Versuch unabhängig von der Stimulation durch EGF beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte in den HEK293-Zellen beobachtet werden, dass Vinexin- β hier keinen Effekt auf die Bindung von Tiam1 an Ras-GTP hatte (Abb. 5.8 B). Allenfalls konnte eine leichte Hemmung der Interaktion unter EGF-Stimulation beobachtet werden, die sich allerdings nicht durch wiederholte Versuche bestätigen ließ. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente haben jedoch zeigen können, dass die Interaktion zwischen Tiam1 und Vinexin- β sich zelltypabhängig auf die Tiam1-Ras-Bindung ausgewirkt hat.

5.1.6 Einfluss von Vinexin- β auf die Tiam1-vermittelte Rac-Aktivierung

Tiam1 gehört biochemisch zur Gruppe der GEF-Proteine und katalysiert spezifisch den GDP/GTP-Austausch der kleinen GTPase Rac (Michiels *et al.*, 1995). Da die spezifische Bindung von Tiam1 und Vinexin- β bereits über verschiedene Methoden nachgewiesen werden konnte, sollte anschließend die Bedeutung von Vinexin- β für die Tiam1-induzierte Aktivierung von Rac in verschiedenen Zellsystemen untersucht werden. Dafür wurden die Vollängen-Konstrukte von Tiam1 und Vinexin- β entweder alleine oder in Kombination transient in COS-7- oder HEK293-Zellen überexprimiert und die Aktivität der GTPase Rac in einem Rac-Aktivitätsassay bestimmt (siehe 4.3.3). Mit diesem Assay konnte innerhalb der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass konstitutiv aktives C1199-Tiam1 in humanen Nierenkarzinomzellen (RCCs) spezifisch zu einer Aktivierung von Rac führt (Engers *et al.*, 2006). Daher wurden für die folgenden Versuche sowohl C1199-Tiam1 als interne Positivkontrolle als auch ein HA- Leervektor als Negativkontrolle transient transfiziert. Die Transfektion der COS-7-Zellen erfolgte mittels der DEAE-Dextran-Methode (siehe 4.2.2.1) während die HEK293-Zellen durch die Calcium-Phosphat-Methode transfiziert wurden (siehe

4.2.2.2). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in *GST-Fish-Puffer* lysiert und gleiche Proteinmengen wurden für den Rac-Aktivitätsassay eingesetzt. Die Expression von endogem Rac und den transfizierten Konstrukten wurden mittels Immunoblots mit kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen die jeweiligen Tags bzw. Rac ermittelt (Abb. 5.9).

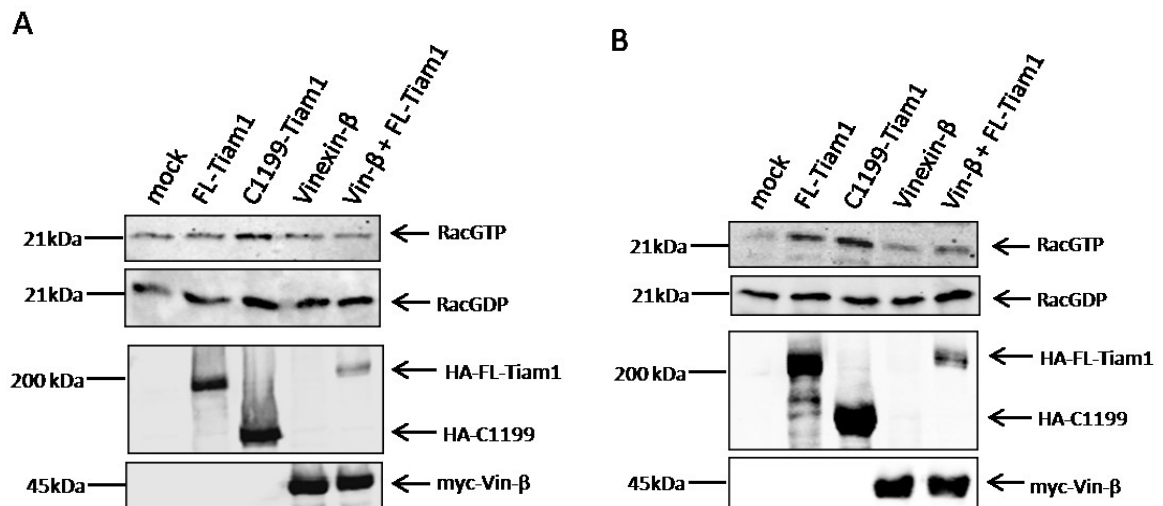


Abb. 5.9: Effekt von Tiam1 und Vinexin-β auf die Aktivität von Rac. Cos-7- (A) und HEK293-Zellen (B). Jeweils gleiche Proteinmengen wurden im Western Blot analysiert. FL- und C1199-Tiam1 wurden in einer 8 % -igen SDS- PAGE aufgetrennt und mittels eines HA-Antikörpers detektiert. Der Nachweis von Vinexin-β und Rac erfolgte über einen anti-Myc- bzw. anti-Rac-Antikörper. RacGTP wurde *im PullDownAssay* über die Bindung an die CRIB-Domäne des Effektors Pak präzipitiert. Die Abbildung ist repräsentativ für n = 3 Versuche.

Der Rac-Aktivitätsassay zeigte, dass konstitutiv aktives C1199-Tiam1, wie erwartet, sowohl in COS-7- als auch in HEK293-Zellen zu einer deutlichen Aktivierung von Rac führt (Abb. 5.9). FL-Tiam1 verursachte in HEK293-Zellen ebenfalls eine deutliche Aktivierung von Rac. In COS-7-Zellen war dagegen im Vergleich zum leeren Vektor nur eine sehr leichte Rac-Aktivierung durch FL-Tiam1 detektierbar. Vinexin-β hatte in beiden Zellsystemen keinen Einfluss auf die Aktivierung von Rac. Auch zusammen mit Tiam1 zeigte Vinexin-β keine signifikanten Effekte auf die Rac-Aktivierung. Der vermeintlich abschwächende Effekt von Vinexin-β auf die Tiam1-induzierte Aktivierung von Rac ist eher durch die schwächere Tiam1-Expression in den doppelt-transfizierten Ansätzen zu erklären.

Die Experimente in 5.1.4 und 5.1.3 gezeigt, dass die Tiam1-Vinexin-β-Interaktion in COS-7-Zellen durch EGF gesteigert wurde, während Vinexin-β aus der Bindung mit dem GEF Sos dissoziiert. Um zusätzlich zu untersuchen, ob die Stimulation des EGF-Rezeptors einen Einfluss auf die Rac-Aktivierung hat, wurde der Rac-Aktivitätsassay zusätzlich unter EGF-

Stimulation in COS-7-Zellen durchgeführt. Dazu wurden COS-7-Zellen wie bereits oben beschrieben in einem Doppelansatz transient Tiam1 und Vinexin- β co-transfiziert. Anschließend erfolgte ein Serumentzug für 24 h. Einer der transfizierten Ansätze wurde für 5 min mit EGF [100 ng/ml] stimuliert, während der andere Ansatz zur Kontrolle unstimuliert blieb. Anschließend wurden die Zellen in *GST-Fish-Puffer* lysiert.

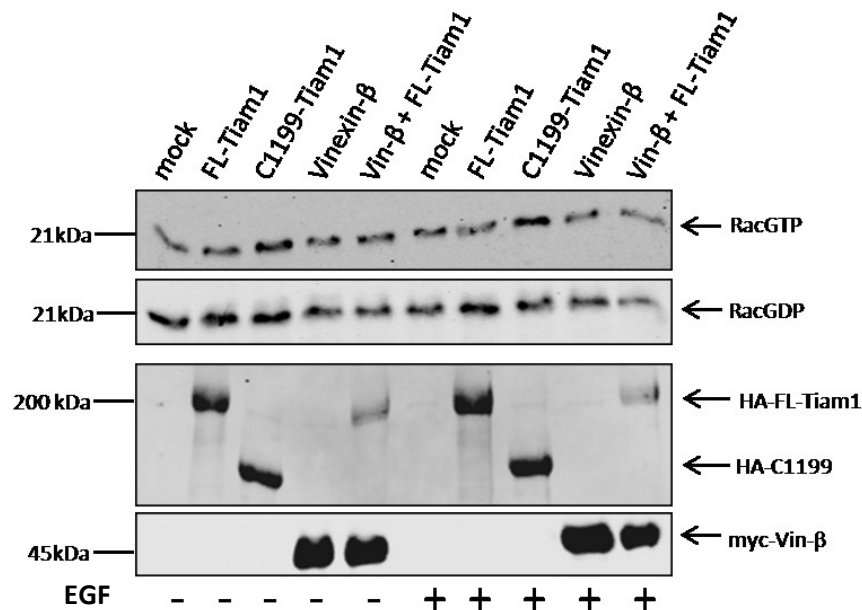


Abb. 5.10: Immunologischer Nachweis von Tiam1, Vinexin- β und Rac in Cos-7-Zellen. Jeweils gleiche Proteinmengen wurden im Western Blot analysiert. FL- und C1199-Tiam1 wurden in einer 8 % -igen SDS- PAGE aufgetrennt und mittels eines HA-Antikörpers detektiert. Der Nachweis von Vinexin- β und Rac erfolgte über einen anti-Myc- bzw. anti-Rac-Antikörper. RacGTP wurde *im PullDownAssay* über die Bindung an die CRIB-Domäne des Effektors Pak präzipitiert. Die Behandlung mit EGF (100 ng/ml) erfolgte für fünf min bei 37°C. Die Abb. ist repräsentativ für n = 2 Versuche.

C1199-Tiam1 führte auch unter EGF-Stimulation zu einer deutlichen Aktivierung von Rac. FL-Tiam1 und Vinexin- β zeigten jedoch weder alleine noch in Kombination gesteigerte Aktivierung von Rac. Auch hier ist der vermeintlich abschwächende Effekt von Vinexin- β auf den Tiam1-Effekt eher durch die schwächere Tiam1-Expression in den doppelt-transfizierten Ansätzen zu erklären.

5.1.6.1 Einfluss von Vinexin- β auf die Rac-vermittelte Signalweitergabe

Die kleine GTPase Rac aktiviert mindestens sechs verschiedene Signalwege unabhängig voneinander (Westwick *et al.*, 1997). Hierfür sind verschiedene Proteinabschnitte bzw. Aminosäuren von Rac verantwortlich (Frost *et al.*, 1996; 1997; Sulciner *et al.*, 1996; Kheradmand *et al.*, 1998; Woo *et al.*, 2000; Engers *et al.*, 2006) Allerdings ist bislang nicht

geklärt unter welchen Bedingungen die spezifische Aktivierung der einzelnen Signalwege durch Rac und Tiam1 erfolgt. Unabhängig von den Ergebnissen des Rac-Aktivitätsassays wurde daher der Einfluss von Vinexin- β auf die Signalwege unterhalb von Rac untersucht. Der Rac-Aktivitätsassay hat gezeigt, dass EGF-Stimulation keine Auswirkungen auf die Effekte von Tiam1 und Vinexin- β hat (Abb. 5.10). Daher wurden die Versuche im Hinblick auf die Rac-vermittelte Signalweitergabe in dieser Arbeit ohne eine zusätzliche Stimulation des EGF-Rezeptors untersucht. Um Aussagen über die Spezifität über verschiedene Zellsysteme hinaus machen zu können, wurden auch hier wieder COS-7- und HEK293-Zellen mit den entsprechenden Methoden transient transfiziert. Die Zellen wurden mit FL-Tiam1 und Vinexin- β entweder alleine oder in Kombination transfiziert. Als zusätzliche Kontrollen wurde in zwei weiteren Ansätzen sowohl ein Leervektor als auch konstitutiv aktives C1199-Tiam1 transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Serumentzug für weitere 24 h synchronisiert und anschließend in Lysepuffer für phosphospezifische Antikörper lysiert. Um eine vorzeitige Dephosphorylierung der zu untersuchenden Proteine zu vermeiden, wurden die Zellen nicht zusätzlich durch Ultraschall aufgeschlossen. Soweit nicht anders vermerkt, waren die hier beschriebenen Versuchsbedingungen identisch für alle in 5.1.6.1 beschriebenen Versuche.

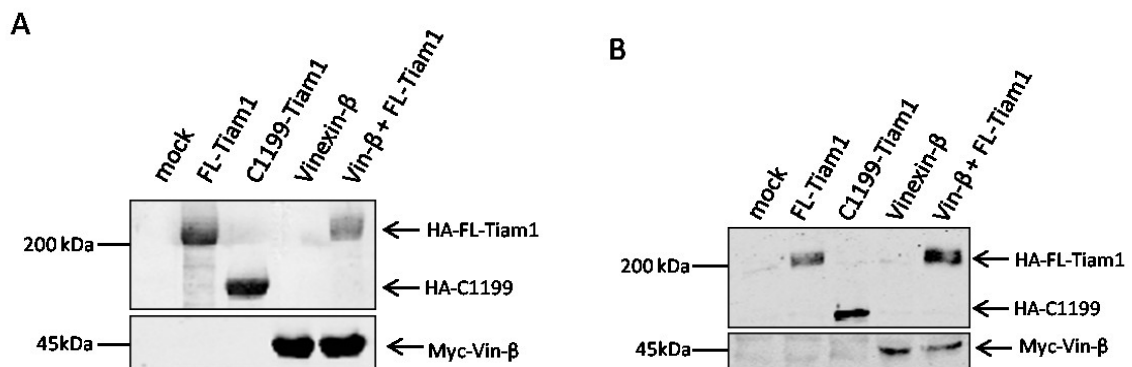


Abb. 5.11: Exemplarischer Expressionsnachweis für FL-Tiam1, C1199-Tiam1 und Vinexin- β nach transienter Transfektion. Die Versuche wurden in Cos7-Zellen (A) und in HEK293-Zellen (B) durchgeführt. Die Tiam1-Konstrukte verfügen über einen HA-Tag und wurden in einer 8 % -igen SDS-PAGE getrennt. Der immunologische Nachweis erfolgte über einen HA-Antikörper. Das transfizierte Vinexin- β -Konstrukt verfügte über einen myc-Tag und konnte so im Western Blot (12 % -ige SDS-PAGE) mittels eines Myc-Antikörper detektiert werden.

Die Abbildung 5.11 zeigt exemplarisch eine Transfektionskontrolle für die in Kapitel 5.1.6.1 durchgeführten Versuche. Die Detektion von Tiam1 erfolgte in allen Versuchen mit Hilfe eines gegen den HA-Tag gerichteten Antikörper. Vinexin- β wurde im Immunoblot über

seinen Myc-Tag detektiert. Dabei zeigte sich nach Transfektion der COS-7-Zellen eine reproduzierbar geringere Transfektionseffizienz für Tiam1 sobald es mit Vinexin- β co-transfiziert wurde. Dieser Effekt wurde bei der weiteren Interpretation der Ergebnisse mit berücksichtigt.

5.1.6.1.1 Regulation von ERK1,2 durch Tiam1 und Vinexin- β

Einer der durch Rac selektiv aktivierten Signalwege führt zu einer Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2. Eine Aktivierung von ERK durch Tiam1 wurde bereits in humanen Nieren- und Kolonkarzinomzelllinien gezeigt (Engers *et al.*, 2006). Vinexin- β hingegen hatte in bisherigen Untersuchungen in adhärenenten Zellen keinen Effekt auf die Aktivierung von ERK (Suwa *et al.*, 2002). Daher sollte ein möglicher Einfluss von Vinexin- β auf die Tiam1-induzierte Aktivierung von ERK untersucht werden. Phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes ERK wurden jeweils mit spezifischen, kommerziell erhältlichen Antikörpern detektiert. Da die Antikörper aus verschiedenen Wirten stammten und die Auswertung des Blots mittels Odyssey Infrared Imaging System erfolgte, konnten beide Antikörper zeitgleich bei verschiedenen Wellenlängen detektiert werden.

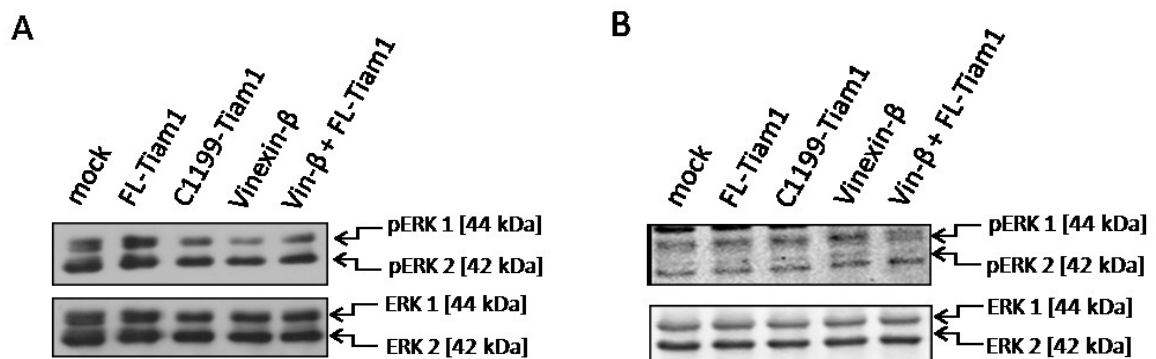


Abb.5.12: Effekt von Tiam1 und Vinexin- β auf die Phosphorylierung von ERK. Der Nachweis für aktives sowie inaktives ERK erfolgte gleichermaßen in COS-7- (A) und HEK293-Zellen (B) über das Odyssey Infrared Imaging System. Dafür wurden die Zellen mit FL-Tiam1, C1199-Tiam1, Vinexin- β und einem Leervektor transient transfiziert. Gleiche Proteinkonzentrationen in einer 10 % -igen SDS-PAGE aufgetrennt. Phosphoryliertes ERK wurde anschließend durch einen phospho-ERK-Antikörper nachgewiesen. Die Abbildung ist repräsentativ für jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Die Analyse für phosphoryliertes ERK (Abb. 5.12) zeigte, dass in beiden Zellsystemen weder Tiam1 noch Vinexin- β Effekte auf die Aktivierung von ERK haben. Der vermeintliche Tiam1-Effekt auf die Phosphorylierung von ERK1 in COS-7-Zellen (Abb. 5.12 A) lässt sich relativieren,

da er sich auftragsbedingt auch bei der Detektion von nicht phosphoryliertem ERK1 widerspiegelt.

5.1.6.1.2 Regulation der p70S6-Kinase durch Tiam1 und Vinexin- β

Als ein weiterer von Tiam1 und Rac beeinflusster Signalweg wurde die Aktivierung der p70S6-Kinase beschrieben. Diese wird bevorzugt aktiviert, wenn Tiam1 N-terminal mit dem Gerüst-Protein Spinophilin interagiert. Die Bindung an Spinophilin bringt Tiam1 in die Nähe der Plasmamembran und steigert so die Möglichkeit für Tiam1 die p70S6-Kinase über Rac selektiv zu aktivieren (Buchsbaum *et al.*, 2003). Die Aktivierung von p70S6 wurde im Western Blot mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Antikörpers untersucht, der nur die aktive Form des Proteins erkennt. Anschließend wurde die Membran gestrippt und mit anti-p70S6-Antikörper reinkubiert, um auftragsbedingte Unterschiede zu berücksichtigen.

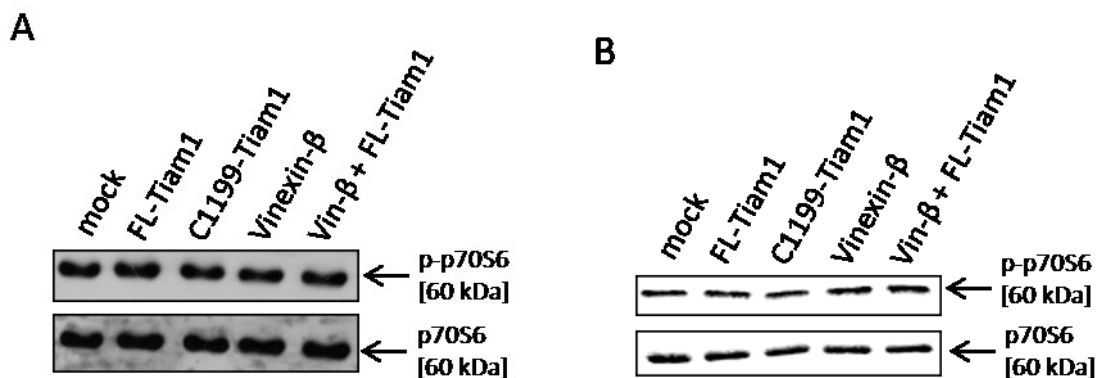


Abb. 5.13: Effekt von Tiam1 und Vinexin- β auf die Phosphorylierung der p70S6-Kinase. Dafür wurde FL-Tiam1, C1199-Tiam1, Vinexin- β und ein Leervektor transient in COS7- (A) oder HEK293-Zellen transfiziert. Die Lysate wurden über 8 %-ige SDS-Gele aufgetrennt. Die aktivierte p70S6-Kinase wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Antikörpers detektiert, der nur die aktive Form des Proteins erkennt. Anschließend wurde die Membran gestrippt und mit anti-p70S6-Antikörper reinkubiert. Die dargestellten Versuche sind repräsentativ für mindestens 2 voneinander unabhängig durchgeführte Versuche pro Zellsystem.

Die in Abb. 5.13 dargestellten Western Blot-Analysen zeigen, dass unabhängig vom Zellsystem weder FL-Tiam1 noch die konstitutiv aktive C1199-Tiam1-Deletionsmutante einen Einfluss auf die Aktivierung der p70S6-Kinase haben. Auch die Expression von Vinexin- β zeigt keinerlei Einfluss auf die Aktivierung von p70S6. Wie daher zu erwarten, zeigt sich auch bei einer Co-Expression von Tiam1 und Vinexin- β kein Effekt auf die Phosphorylierung der p70S6-Kinase.

5.1.6.1.3 Regulation von CyclinD1 durch Tiam1 und Vinexin- β

Für die p70S6-Kinase wurde gezeigt, dass sie eine wesentliche Rolle für die Regulation der CyclinD1-Expression spielt (Koziczak & Hynes, 2004). CyclinD1 und auch Tiam1 spielen eine wichtige Rolle für die onkogene Transformation Ras-induzierter Hauttumore im Mausmodell (Malliri *et al.*, 2002; Robles *et al.*, 1998). Außerdem ist CyclinD1 in Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp ein direktes Zielgen des *Wnt*-Signalwegs (Buongiorno *et al.*, 2008). Auch der Tiam1/Rac-Signalweg überschneidet sich mit dem *Wnt*-Signalweg und spielt demzufolge auch eine Rolle für die maligne Transformation intestinaler Tumore (Malliri *et al.*, 2005). Hier sollte der Effekt von Vinexin- β auf die Aktivierung von CyclinD1 und auf die Tiam1-induzierten Effekte untersucht werden. Die Expression von CyclinD1 wurde mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper überprüft. Um auftragungsbedingte Unterschiede zu vermeiden, wurde die Membran im Anschluss an die CyclinD1-Inkubation gestrippt und mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert. Die Detektion erfolgte anschließend durch das Odyssey Infrared Imaging System.

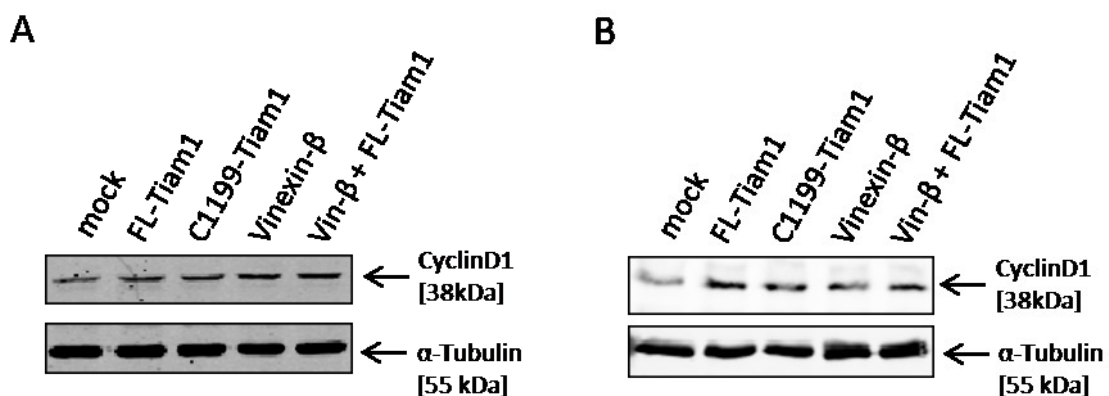


Abb. 5.14: Effekt von Tiam1 und Vinexin- β auf CyclinD1. Dafür wurde FL-Tiam1, C1199-Tiam1, Vinexin- β und ein Leervektor transient transfiziert. Die Trennung der Lysate erfolgte über eine 12 %-ige SDS-PAGE, die Detektion von CyclinD1 mit einem spezifischen Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper. Anschließend wurden die Membranen gestrippt und mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert. (A) zeigt ein repräsentatives Ergebnis für die in COS-7-Zellen durchgeführten Versuche ($n = 2$). In (B) ist das Ergebnis eines in HEK293-Zellen durchgeführten Versuches abgebildet ($n = 3$).

Bei diesem Versuch zeigten sich in Abhängigkeit vom Zellsystem unterschiedliche Einflüsse von Tiam1 und Vinexin- β auf die Expression von CyclinD1. In COS-7-Zellen (Abb. 5.14 A) hat FL-Tiam1 keinen Effekt auf die CyclinD1-Expression. Zudem resultiert weder die Expression

von C1199-Tiam1 noch von Vinexin- β in einer gesteigerten Expression von CyclinD1. Somit bleibt auch eine Überexpression von Tiam1 zusammen mit Vinexin- β in COS-7-Zellen ohne Effekt für CyclinD1. Das Ergebnis unterscheidet sich allerdings von den Resultaten in HEK293-Zellen (Abb. 5.14 B). Eine Expression von Tiam1 (FL- und C1199-Tiam1) führt zu einer gesteigerten CyclinD1-Expression. Auch die Vinexin- β hatte tendenziell einen steigernden Effekt auf die Proteinmenge von CyclinD1. Die durchgeführten Versuche zeigten, dass Tiam1 und Vinexin- β ähnliche induzierende Effekte auf die Expression von CyclinD1 haben. Allerdings unterschieden sich die Ergebnisse im Hinblick auf den verwendeten Zelltyp.

5.1.6.1.4 Regulation von NF- κ B durch Tiam1 und Vinexin- β

Der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert die Transkription verschiedenster Gene, die verantwortlich für die Zellproliferation, Adhäsion und den Zelltod sind. Durch seinen Einfluss auf die Apoptose spielt NF- κ B auch eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung und –progression (Ross *et al.*, 2004). Die Aktivierung von NF- κ B wird durch verschiedene Einflüsse stimuliert (Bäuerle & Henkel, 1994). Sulciner *et al.* (1996) konnten zudem zeigen, dass NF- κ B in HeLa-Zellen redox-abhängig durch Rac aktiviert wird. Um den Einfluss der Rac-vermittelten Signalweitergabe in Bezug auf NF- κ B näher bestimmen zu können sollte der Einfluss von Tiam1 und Vinexin- β auf die Aktivierung von NF- κ B untersucht werden. Die Expression der aktiven Form von NF- κ B (p65) wurde im Western Blot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers analysiert und die Membran mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert.

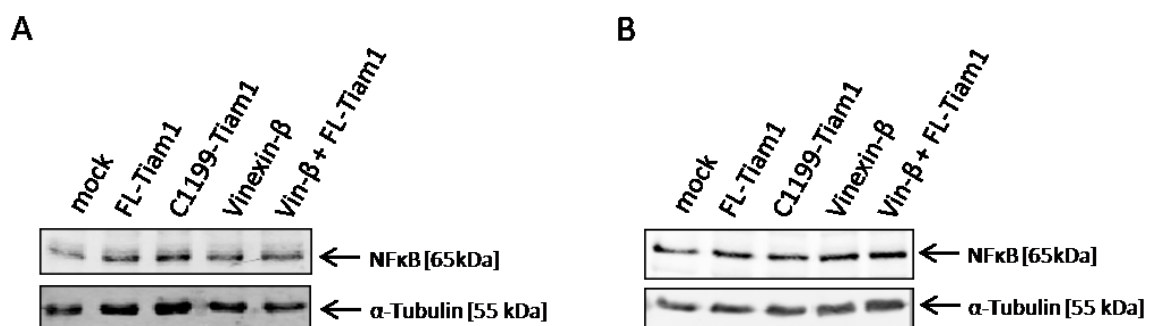


Abb. 5.15: Effekt von Tiam1 und Vinexin- β auf NF- κ B. FL-Tiam1, C1199-Tiam1, Vinexin- β und ein Leervektor wurden transient transfiziert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Lysate erfolgte über eine 8 % -ige SDS-PAGE und die Detektion von NF κ B erfolgte mit einem spezifischen Antikörper und entsprechendem Sekundärantikörper. Die Membranen wurden im Anschluß gestrippt und mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert. (A) Repräsentatives Ergebnis für die durchgeführten Versuche in COS-7-Zellen (n=2). (B) Repräsentatives Ergebnis für in HEK293-Zellen durchgeführte Versuche (n=2).

Die Western Blot-Analysen demonstrierten unabhängig vom verwendeten Zellsystem, dass weder Tiam1 noch Vinexin- β Einfluss auf die Expression von NF- κ B hatten. Die geringen Unterschiede in der NF- κ B-Expression in Abbildung 5.15 A waren auf die Schwankungen innerhalb der aufgetragenen Proteinmengen zurückzuführen.

5.1.6.1.5 Selektive ROS-Aktivierung durch Tiam1 und Vinexin- β

Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) gelten nicht nur als toxische Nebenprodukte eines oxidativen Stoffwechsels, sondern auch als Botenstoffe, die in die Signaltransduktion integriert sind (Fukai *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 2004). Das Gleichgewicht zwischen der Bildung und dem Abbau von ROS ist für die Aufrechterhaltung physiologischer Prozesse in einer Zelle von entscheidender Bedeutung (Droge, 2002). Ein Ungleichgewicht zugunsten der Bildung von ROS wird als oxydativer Stress bezeichnet (Fattmann *et al.*, 2003). Aufgrund ihrer hohen Reaktionsfähigkeit können ROS Makromoleküle wie Proteine und Nukleinsäuren schädigen.

Die GTPase Rac induziert die Bildung von ROS, die in RCC-Zellen zu einer gesteigerten ERK-Aktivierung führt (Engers *et al.*, 2006). Da die Effekte von Tiam1 und Rac zelltypabhängig sind, sollte innerhalb der Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation untersucht werden, ob die Tiam1/Rac-induzierte ROS-Aktivierung sich von dem oben genannten Zellsystem (RCC-Zellen) auch auf COS7-Zellen übertragen lässt und ob auch die Expression von Vinexin- β zu einer gesteigerten ROS-Produktion führt. Dazu wurden COS-7-Zellen transient mit FL-Tiam und/oder Vinexin- β transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C mit 20 μ M DCF-DA in DMEM ohne FCS behandelt. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und mit PBS gewaschen. Die Messung der ROS erfolgte nach Aufnahme der Zellen in PBS + 0,5 % FCS im Durchflusszytometer. Aus einem einbehaltenen Aliquot der Zellen wurde die Expression der transfizierten Proteine im Western Blot überprüft.

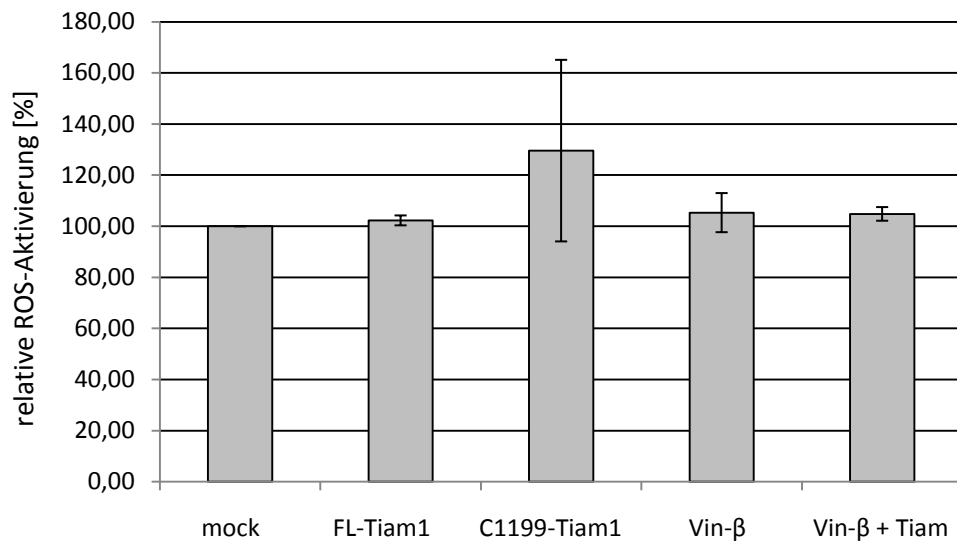


Abb. 5.16: Bildung von ROS durch Tiam1 und Vinexin-β. COS-7-Zellen wurden mit FL-Tiam1, C1199-Tiam1, Vinexin-β und Tiam1/Vinexin-β transfiziert und nach 48 h für 60 min mit DCF-DA [20 μM] in serumfreien DMEM behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die intrazelluläre Fluoreszenz gemessen. Für die Standardisierung wurde das Fluoreszenzsignal der mit dem Leervektor (= *mock*) transfizierten Zellen auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung (S.E.M) (n = 3).

Wie in Abbildung 5.16 zu sehen ist, zeigte FL-Tiam1 keine gesteigerte Aktivierung von ROS im Vergleich zum leeren Vektor (*mock*). Auch transient transfiziertes Vinexin-β hatte keinen Einfluss auf die Bildung von ROS. Lediglich die konstitutiv aktive C1199-Tiam1-Deletionsmutante zeigte einen schwachen messbaren Anstieg der ROS-Bildung, der jedoch nicht signifikant war.

5.1.6.1.6 Regulation von Akt durch Tiam1 und Vinexin-β

Die GTPase Rac und auch das C-terminale DH-PH-Domänentandem von Tiam1 aktivieren in NIH/3T3-Zellen Akt, das wie p38 und p70S6 eine Serin/Threonin-Kinase ist (Singh *et al.*, 2004). Konstitutiv aktives Akt führt zu einer gesteigerten Zellproliferation und einer erhöhten Apoptoseresistenzrate. Es hat daher eine entscheidende Bedeutung bei der Transformation von Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Tiam1 und Vinexin-β auf die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt in COS-7- und HEK293-Zellen untersucht.

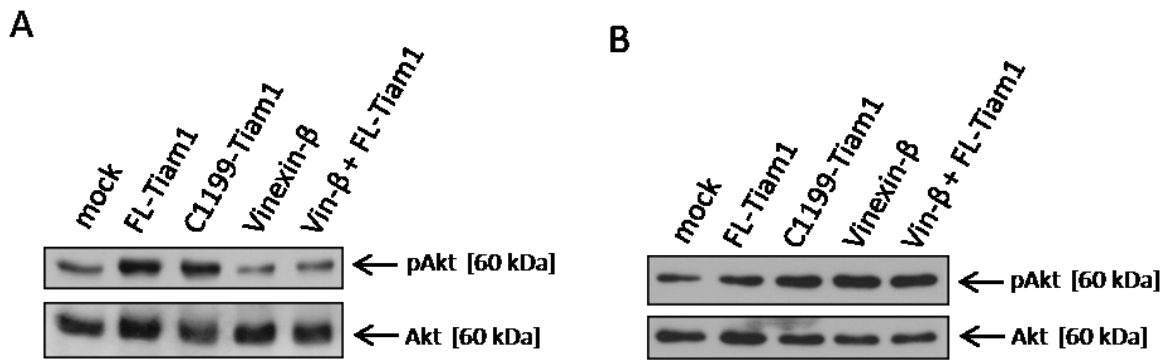


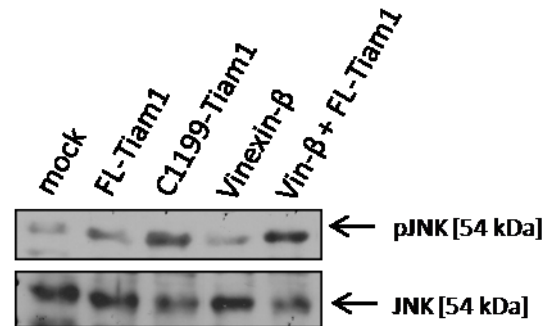
Abb. 5.17: Effekt von Tiam1 und Vinexin-β auf Akt. FL-Tiam1, C1199-Tiam1, Vinexin-β und ein Leervektor wurden transient transfiziert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Lysate erfolgte über eine 8 % -ige SDS-PAGE und die Detektion von phospho-Akt erfolgte über einen spezifischen Antikörper und entsprechendem Sekundäntikörper. Die Membranen wurden im Anschluss gestrippt und mit anti-Akt-Antikörper reinkubiert. (A) Repräsentatives Ergebnis für die durchgeführten Versuche in COS-7-Zellen (n=4). (B) Repräsentatives Ergebnis für in HEK293-Zellen durchgeführte Versuche (n=3).

Die Ergebnisse in Abbildung 5.17 zeigen, dass FL-Tiam1 und C1199-Tiam1 in COS-7- und HEK293-Zellen die Phosphorylierung von Akt deutlich steigerten. Für Vinexin-β ergaben sich allerdings im Rahmen der Phosphorylierungsanalysen für Akt unterschiedliche Ergebnisse im Hinblick auf die verwendeten Zellsysteme. In COS-7-Zellen (Abb. 5.17 A) hatte Vinexin-β keinen Effekt auf die Aktivierung von Akt. Die mit Tiam1 und Vinexin-β co-transfizierten Ansätze zeigten im Vergleich zu FL-Tiam1 eine deutliche Hemmung der Tiam1-induzierten Akt-Phosphorylierung. Im Gegensatz zu den Effekten von Vinexin-β in COS-7-Zellen, zeigte sich in HEK293-Zellen (Abb. 5.17 B), dass Vinexin-β ähnlich wie Tiam1 zu einer deutlichen Phosphorylierung von Akt führte. Ein kumulativer Effekt in den Tiam1/Vinexin-β-transfizierten Ansätzen war allerdings nicht zu beobachten.

5.1.6.1.7 Regulation der c-Jun-Kinase durch Tiam1 und Vinexin-β

Die Aktivierung von Rac durch Tiam1 führt in COS-7-Zellen zu einer Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) (Michels *et al.*, 1997). Auch Vinexin-β spielt eine Rolle in der EGF-induzierten Aktivierung von JNK. Dafür ist allerdings die Interaktion von Vinexin-β mit dem GEF Sos von entscheidender Bedeutung (Akamatsu *et al.*, 1999). Hier sollte untersucht werden, ob auch die Interaktion von Vinexin-β und Tiam1 die Regulation der JNK beeinflusst. Die Expression von phosphorylierter JNK wurde im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper analysiert. Die Membran wurde im Anschluss daran gestrippt und mit JNK-Antikörper reinkubiert.

Abb. 5.18: Effekt von Tiam1 und Vinexin- β auf die Phosphorylierung der c-Jun-Kinase. FL-Tiam1, C1199-Tiam1, Vinexin- β und ein Leervektor wurden transient transfiziert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Lysate erfolgte über eine 10 % -ige SDS-PAGE und die Detektion von phospho-JNK erfolgte über einen spezifischen Antikörper und entsprechendem Sekundärantikörper. Die Membranen wurden im Anschluss gestrippt und mit anti-JNK-Antikörper reinkubiert.



Die Abb. 5.18 repräsentiert einen einzelnen Versuch und kann daher auch nur für sich genommen interpretiert werden. FL-Tiam und C1199-Tiam zeigten in diesem Versuch eine gesteigerte Aktivierung von JNK in Vergleich zum leeren Vektor (*mock*). Die Aktivierung von JNK durch Tiam1 in COS-7-Zellen konnte schon in früheren Experimenten gezeigt werden (Michiels *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Aktivierung nicht reproduzierbar über verschiedene Experimente hinweg belegt werden. Allerdings konnte in drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gezeigt werden, dass Vinexin- β alleine und ohne die Stimulation des EGF-Rezeptors keinen Effekt auf die JNK-Phosphorylierung hatte.

5.1.6.1.8 Einfluss von Tiam1 und Vinexin- β auf die cytosolische Phospholipase (cPLA₂)

Die Aktivierung der cytosolischen Phospholipase A₂ (cPLA₂) spielt eine wesentliche Rolle für die Rac-induzierte Aktivierung des *Serum Response Elements* (SRE) über den *Serum Response Factor* (SRF) (Kim & Kim, 1997; Woo *et al.*, 2000). Der Einfluss von Tiam1 und Vinexin- β auf die cPLA₂ wurde in einem Luciferase-Reportergen-Assay indirekt über die Aktivierung des SRE-Promotors bestimmt. Dazu wurden COS-7-Zellen mit FL-Tiam1 und/oder Vinexin- β und dem SRE-Dimer in pA3LUC co-transfiziert. Für diesen Versuch wurde konstitutiv aktives Rac1 G12V, das zu einer gesteigerten Aktivierung des SRF führen sollte, als interne Positivkontrolle verwendet (Kim & Kim, 1997). Um die Transfektionseffizienz bzw. Variationen der Zellzahl in jedem Ansatz zu normieren, wurden alle Ansätze mit einem Reportergenkonstrukt für Renilla-Luciferase in pRL-TK co-transfiziert. Mit Hilfe dieser Werte wurden die Luciferase-Werte normiert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit lysiert. Anschließend wurden die Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivitäten bestimmt, sowie der Erfolg der Transfektion überprüft. Für jedes durchgeführte Experiment wurde ein dreifach-Ansatz transfiziert und gemessen.

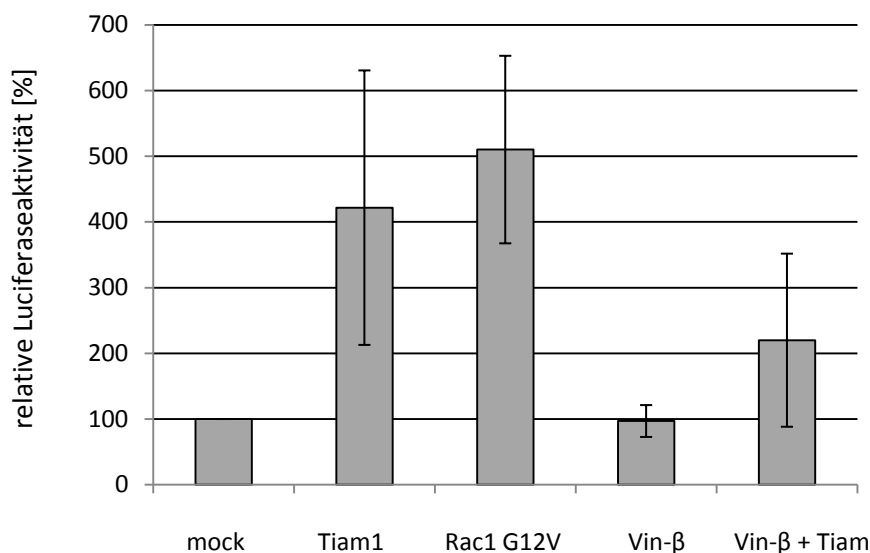


Abb. 5.19: Effekt von Tiam1 und Vinexin-β auf die Aktivität des Serum Response Elements. Cos-7-Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transient transfiziert und anschließend mit Hilfe eines Dual-Luciferase-Reportergen-Assays auf die Promotoraktivität des *Serum Response Elements* untersucht. Die Transfektionsexperimente wurden für vier unabhängige Versuche jeweils im dreifach-Ansatz durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M (n = 4).

Konstitutiv aktives Rac1 G12V führte, wie erwartet, zu einer deutlich gesteigerten Aktivierung des SRE. Auch FL-Tiam1 führte zu einer signifikanten Steigerung der Promotoraktivität im Vergleich zum leeren Vektor (*mock*). Vinexin-β hingegen hatte keinen Effekt auf die Promotoraktivität. Die Co-Expression von Vinexin-β und Tiam1 zeigte eine deutlich geringe Aktivierung des Promotors als Tiam1 alleine aber eine Steigerung im Vergleich zum leeren Vektor. Die Expression von Vinexin-β resultierte in einer Reduktion der Tiam1-induzierten Promotoraktivität.

5.1.7 Funktionelle Relevanz der Tiam1-Vinexin-β-Interaktion im Hinblick auf die Regulation der Migration

In eigenen Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit konnten Engers *et al.*, (2001 & 2006) zeigen, dass Tiam1 und Rac in humanen Nieren- (ClearCa-28) und Kolonkarzinomzellen (Dus-Col1B) zu einer signifikanten Hemmung der Invasion und Migration führen. Zudem wurde mit der selektiven Hochregulation von TIMP-1 und -2 ein neuer molekularer Mechanismus identifiziert, über den die Invasivität dieser Zellen durch Tiam1 und Rac gehemmt wird (Engers *et al.*, 2001; 2006). Daher sollte weiterführend untersucht werden, ob der neu entdeckte Tiam1-Bindungspartner Vinexin-β in diesen Zelllinien einen Einfluss auf die Sekretion von TIMP-1 und/oder -2 hat und welche zellbiologische Eigenschaften von Tiam1 und Rac durch Vinexin-β beeinflusst werden. Dazu sollten im Rahmen dieser Arbeit die

Karzinomzellen zum einen stabil mit Vinexin- β transfiziert bzw. mit konstitutiv aktivem C1199-Tiam1 und Vinexin- β co-transfiziert werden. Zum anderen sollte die Expression von Vinexin- β in den entsprechenden Zellen mittels RNA Interferenz (RNAi) herunter reguliert werden. Anschließend sollten in den transgenen Zelllinien ein *in vitro* Assay zur Bestimmung der Zellmigration durchgeführt (siehe 4.2.5.1) und weiterhin durch Untersuchungen der Sekretion von TIMP-1 und -2 sowie MMP-2 und -9 die Fähigkeit zur Invasion beurteilt werden.

5.1.7.1 **Entwicklung stabil transfizierter Zelllinien**

In dieser Arbeit sollten stabile Karzinomzelllinien generiert werden, in denen Vinexin- β einerseits überexprimiert wurde, andererseits sollte die Expression von Vinexin- β durch *knockdown* mittels RNAi spezifisch gehemmt werden.

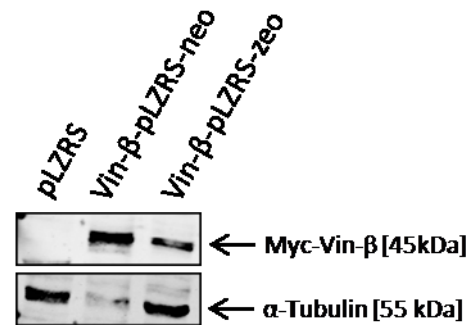
5.1.7.1.1 Stabile Transfektion von Myc-Vinexin- β -pLZRS-IRESneo/zeo in Karzinomzelllinien

Für die stabile Transfektion sollten die Karzinomzelllinien DusCol-1B-(Kolon) und clearCa-28-(Niere) Zellen bzw. bereits mit C1199-Tiam1 stabil transfizierte DusCol-1B- und clearCa-28-Zellen genutzt werden. Diese Zellen wurden als Krebsmodelle ausgewählt, weil die Interaktion zwischen Tiam1 und Vinexin- β zum einen in einer humanen cDNA-Bank der Niere detektiert wurde. Zum anderen waren diese Zellen durch andere Untersuchungen bereits stabil mit der konstitutiv-aktiven C1199-Tiam1-Deletionsmutante transfiziert, so dass lediglich Vinexin- β in die entsprechenden Zellen transfiziert werden musste. Myc-getaggtetes Vinexin- β sollte in die Expressionsvektoren pLZRS-IRESneo und pLZRS-IRESzeo kloniert werden. Diese Vektoren eignen sich durch ihre Resistenzgene für Neomycin bzw. Zeocin für die stabile Transfektion. Die Klonierungsarbeiten waren jedoch nicht erfolgreich, wenn Myc-Vinexin- β mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus dem Expressionsvektor pMT2SM herausgeschnitten und anschließend die pLZRS-Vektoren eingefügt wurden. Obwohl die Konstrukte erfolgreich sequenziert werden konnten, wurde Myc-Vinexin- β nach transienter Transfektion in COS-7- und HEK293-Zellen nicht exprimiert. Daher wurde auf eine andere Klonierungsstrategie ausgewichen. Vinexin- β wurde zusammen mit einem Myc-Tag mit Hilfe der in 3.8.3 aufgeführten Primer anhand der DNA von Myc-Vinexin- β -pMT2SM als Template amplifiziert und anschließend in die pLZRS-IRES-neo/-zeo-Expressionsvektoren kloniert. Der Erfolg der Klonierung wurde anschließend durch Sequenzierungen in beide

Richtungen überprüft und die erfolgreiche Expression des Proteins durch transiente Transfektion in HEK293-Zellen und anschließenden Immunoblot bestätigt (Abb. 5.20).

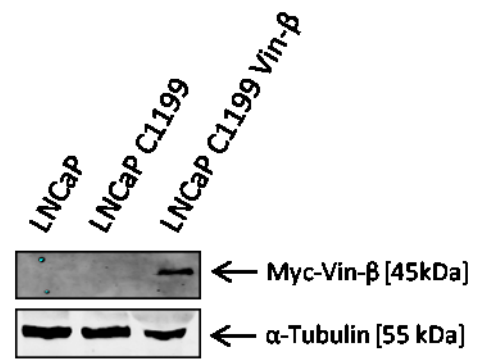
Abb. 5.20: Immunologischer Nachweis von Myc-Vinexin- β - pLZRS-neo/-zeo nach Transfektion von HEK293-Zellen.

Die Zellen wurden transient mit den erfolgreich klonierten Myc-Vinexin- β -Konstrukten oder einem leeren pLZRS-Vektor transfiziert. Für den Western Blot wurden jeweils gleiche Proteinmengen der Zelllysate über eine 12 % -ige SDS-PAGE aufgetrennt. Myc-Vinexin- β wurde durch anti-Myc-Antikörper detektiert. Anschließend wurde die Membran gestrippt und zur Kontrolle mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert.



Nachdem die erfolgreiche Expression des klonierten Vinexin- β -Konstrukts im Western Blot bestätigt wurde, sollten im weiteren Verlauf der Arbeit die oben erwähnten DusCol-1B- und clearCa-28-Zellen mit den generierten Konstrukten stabil transfiziert werden. Die Transfektionen wurden wiederholt mit den Transfektionsreagenzien FuGENE® (Promega) und Lipofectamin™ (Invitrogen) und zusätzlich mit Hilfe von retroviraler Transduktion durchgeführt. Allerdings konnte in keinem der durchgeführten Ansätze eine erfolgreiche Transfektion und damit stabile Expression von Vinexin- β in den ausgewählten Zellen erreicht werden. Daher wurden LNCaP-Zellen für die stabilen Transfektionen ausgewählt. Diese Zellen wurden ausgesucht, weil bereits transgene C1199-Tiam1-LNCaP-Zellen verfügbar waren. Die Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamin mit Myc-Vinexin- β -pLZRSneo transfiziert. Zusätzlich wurden die transgenen C1199-Tiam1-LNCaP-Zellen mit Myc-Vinexin- β -pLZRSzeo transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst und in Selektionsmedium überführt. Im Laufe der folgenden Wochen konnte ein Zeocin resistenter LNCaP C1199 + Vinexin- β -Pool generiert werden. Dieser wurde solange subkultiviert bis ausreichend Zellen für eine Kryokonservierung (siehe 4.2.1.1) vorhanden waren. Erst im Anschluß daran wurde der Rest der Zellen auf eine erfolgreiche Expression von Vinexin- β getestet und mit der Ausgangszelllinie LNCaP sowie LNCaP + C1199-Tiam1 verglichen (Abb. 5.21).

Abb. 5.21: Immunologischer Nachweis von Myc-Vinexin- β in stabil transfizierten LNCaP C1199-Zellen. Die Zellen wurden stabil mit Myc-Vinexin- β -pLZRS-zeo transfiziert. Für den Western Blot die Zelllysate über eine 12 % -ige SDS-PAGE aufgetrennt. Myc-Vinexin- β wurde mittels eines Myc-Antikörpers im Immunoblot detektiert. Anschließend wurde die Membran gestrippt und zur Kontrolle mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert.



Im Rahmen dieser Transfektionsversuche wurde auch hier keine stabile Transfektion von Myc-Vinexin- β -pLZRSneo in LNCaP-Zellen erreicht, so dass zwar die Kombination C1199-Tiam1 und Vinexin- β vorhanden war, Vinexin- β aber nicht alleine in LNCaP-Zellen exprimiert werden konnte. Da der Einfluss von Vinexin- β alleine in den LNCaP-Zellen daher nicht vergleichend untersucht werden konnte wurden auch die stabil transfizierten LNCaP C1199 Tiam1 + Vinexin- β -Zellen nicht für nachfolgende Versuche verwendet.

5.1.7.1.2 Klonierung von Vinexin- β sh-RNA in pRETRO-SUPER für den spezifischen *knockdown* von Vinexin- β

Durch die stabile Transfektion mit dem shRNA-Expressionsvektor pRETRO-SUPER sollte die mRNA von Vinexin- β gespalten und damit die Translation des Proteins in der Zelle unterbunden werden. Dafür musste zunächst eine spezifische Zielsequenz in der mRNA von Vinexin- β ausgewählt werden. Die Effektivität eines *knockdowns* kann durch die Syntheserate, der Stabilität der shRNA in der Zelle und auch durch die Länge und Sequenz des Loops beeinflusst werden (Brummelkamp *et al.*, 2002). Zudem können ausgebildete Sekundärstrukturen und mRNA-gebundenen Proteine Sequenzen der mRNA verdecken, so dass nicht alle Bereiche für die siRNA gut zugänglich sind (Elbashir *et al.*, 2001b). Zur Unterstützung der Sequenzauswahl können verschiedene Programme hinzugezogen werden (Pei & Tuschl, 2006). In dieser Arbeit wurde die ausgewählte Sequenz zum effektiven *knockdown* von Vinexin- β basierend aus den Ergebnissen von Mitsushima *et al.*, (2006) modifiziert. Die Zielsequenz für den spezifischen *knockdown* von Vinexin- β war ⁽¹⁹⁶⁹⁾5'-ACCCAGAAAUUCGGAACGU-3'⁽¹⁹⁸⁷⁾. Die Auswahl des Loops erfolgte unter Einbezug der Ergebnisse von McIntyre & Fanning (2006). Die shRNA-codierende Sequenz wurde, wie unter 4.1.11.3 beschrieben in den pRETRO-SUPER kloniert. Parallel dazu wurde ein Kontroll-Insert

in pRETRO-SUPER kloniert, das sich von der shRNA-Sequenz nur durch den Austausch von zwei Basen unterscheidet, die zur ausgewählten Zielsequenz nicht komplementär sind. Damit sollte die Spezifität der gegen Vinexin- β gerichteten shRNA überprüft werden, denn schon durch die Fehlpaarung eines einzelnen Basenpaares sollte die Repression der Translation durch RNAi verhindert werden (Brummelkamp *et al.*, 2002). Dieses Konstrukt wird im Folgenden als *scrambled (scr)*-Kontrolle bezeichnet.

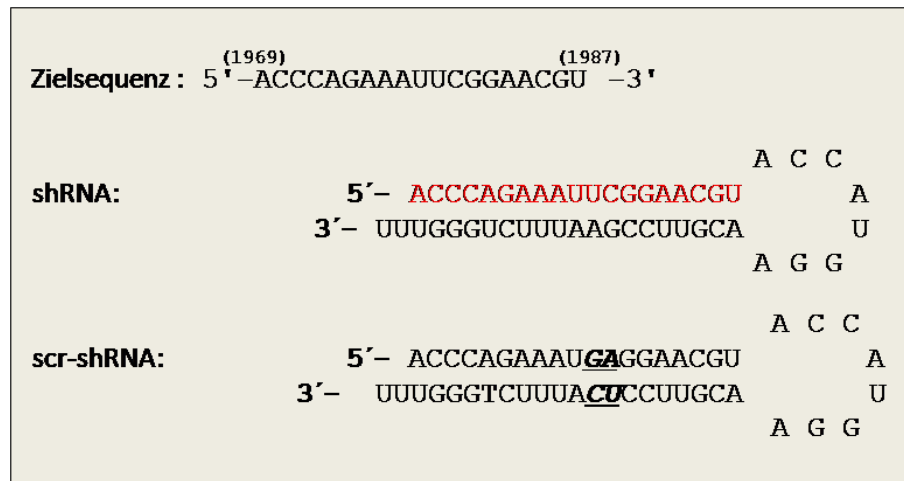


Abb. 5.22: Zielsequenz und Aufbau der sh-RNA für Vinexin- β . Der Loop umfasst acht Nukleotide und beinhaltet eine *NcoI*-Schnittstelle. Die Schnittstelle wurde eingefügt, um die Haarnadelstruktur vor der Sequenzierung aufzubrechen und diese somit zu erleichtern. Für die *scrambled (scr)*-Kontrolle wurden zwei Nukleotide (kursiv dargestellt) ersetzt, um die Spezifität der gegen Vinexin- β gerichteten shRNA zu überprüfen.

Um den induzierbaren *knockdown* von Vinexin- β durch die klonierten shRNA-Konstrukte zu testen, wurden sie transient in einem Doppelansatz in HEK293-Zellen transfiziert, da diese Zellen endogen Vinexin- β exprimieren. Nach 48 und 72 h wurden die Zellen lysiert und gleiche Proteinmengen wurden in einer 12 % -igen SDS-PAGE aufgetrennt. Außerdem wurde der *knockdown* für Vinexin- β parallel auf RNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) untersucht. Bei den scr-sh-Vinexin- β -transfizierten Zellen sollte im Gegensatz zu den mit Vinexin- β shRNAtransfizierten Zellen keine Herunterregulation von Vinexin- β zu beobachtet sein, da die Zielsequenz durch den Austausch von zwei Basen durch den sog. RISC-Komplex nicht erkannt werden sollte. Die Abbildung 5.23 zeigt, dass 48 h nach der Transfektion eine deutliche Herabregulation der Vinexin- β mRNA zu beobachten war. Nach 72 h war der Effekt durch das transient transfizierte sh-Vinexin- β -Konstrukt auf RNA-Ebene allerdings nicht mehr sichtbar. Die Western Blot-Analysen zeigten zwar bereits nach 48 h

einen schwachen *knockdown* von Vinexin- β im Vergleich zu scr-Vinexin- β . Durch die natürliche Verzögerung zwischen RNA- und Proteinebene konnte jedoch erst 72 h nach der Transfektion eine deutliche Reduktion des Vinexin- β Proteins beobachtet werden.

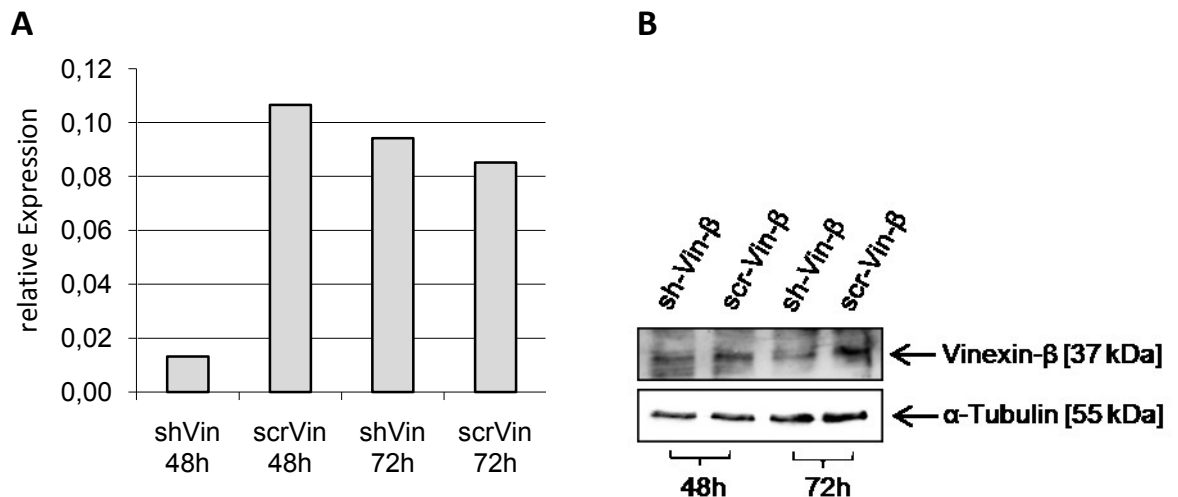


Abb. 5.23: Knockdown von Vinexin- β in HEK293-Zellen. Die Zellen wurden transient mit sh-/scr-Vinexin- β transfiziert und nach 48/72 h lysiert bzw. die RNA extrahiert. (A) Vergleich von sh-/scr-Vinexin- β mittels semiquantitativer qPCR. (B) Die Auftrennung im Western Blot erfolgte über eine 12 % -ige SDS-PAGE und die Antikörperinkubation mit anti-Vinexin- β -Antikörper. Danach wurde die Membran gestrippt und mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert.

5.1.7.1.3 Stabile Transfektion von *pRetroSuper* zum *knockdown* von Vinexin- β in LNCaP-Zellen

Da das klonierte sh-Vinexin- β -pRS-Konstrukt erfolgreich zu einem spezifischen *knockdown* von Vinexin- β führte, sollte es stabil in LNCaP-Zellen transfiziert werden. LNCaP-Zellen exprimieren endogenes Vinexin- β , so dass hier ein *knockdown* gut zu untersuchen sein sollte. Als Kontrolle wurde das scr-Vinexin- β -pRS-Konstrukt in die LNCaP-Zellen transfiziert. Beide Konstrukte wurden mit Hilfe von Lipofectamin™ in die LNCaP-Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Selektionsmedium transferiert. Im Laufe der folgenden Wochen konnte ein Blasticidin-resistenter LNCaP + sh-Vinexin- β -Pool generiert werden. Dieser wurde solange subkultiviert bis ausreichend Zellen für eine Kryokonservierung vorhanden waren. Anschließend wurde der Rest der Zellen auf den *knockdown* von Vinexin- β getestet. Daher wurden von den stabil transfizierten Zellen Zelllysate hergestellt, um den *knockdown* von Vinexin- β im Western Blot nachweisen zu

können. Zusätzlich wurde die RNA der Zellen extrahiert, um den spezifischen Abbau der Vinexin- β -mRNA untersuchen zu können.

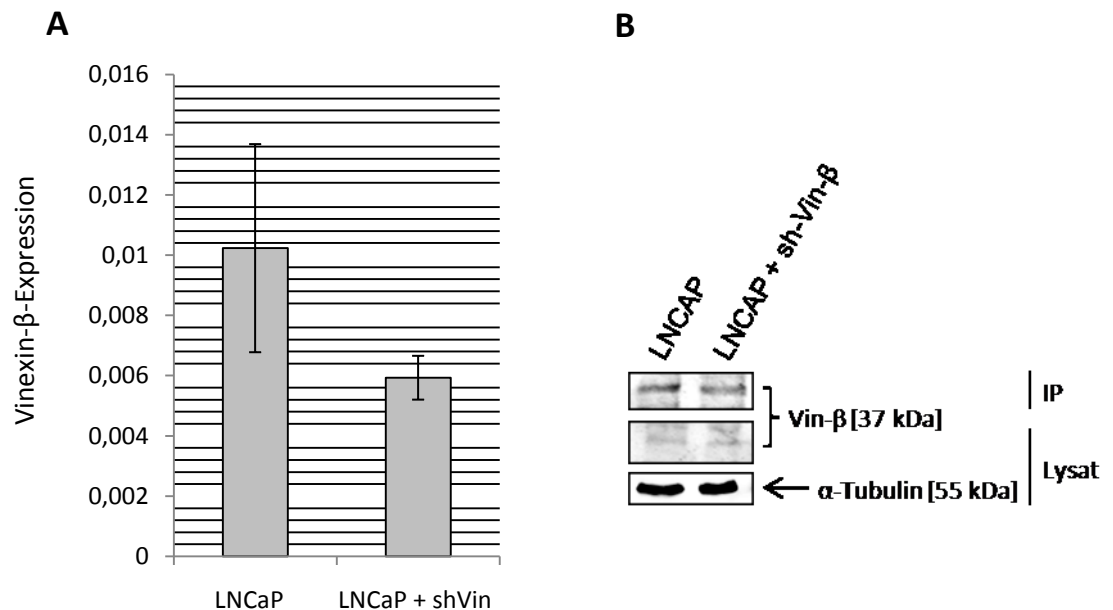


Abb. 5.24: Nachweis von Vinexin- β auf RNA- und Proteinebene in LNCaP-Zellen. Die Zellen wurden transient mit sh-Vinexin- β transfiziert oder untransfiziert belassen und nach 48/72 h lysiert bzw. die RNA extrahiert. (A) Vergleich von sh-Vinexin- β und untransfizierten Zellen mittels semiquantitativer qPCR. (B) Die Auftrennung im Western Blot erfolgte über eine 12 % -ige SDS-PAGE und die Antikörperinkubation mit anti-Vinexin- β -Antikörper. Danach wurde die Membran gestript und mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert.

Die Abb. 5.24 A zeigt das Expressionsniveau der Vinexin- β -mRNA in den stabil transfizierten Zellen im Vergleich zu untransfizierten LNCaP-Zellen. Der durch RNAi induzierte *knockdown* von Vinexin- β betrug ca. 40 %. Allerdings gestaltete sich der Nachweis des induzierten knockdowns von Vinexin- β auf Proteinebene schwierig (Abb. 5.24 B). Zudem war die Qualität der kommerziell erhältlichen Vinexin- β -Antikörper nicht sehr gut. Im totalen Lysat konnte kein deutlicher Vinexin- β -*knockdown* detektiert werden. Um das Protein im Lysat anzureichern und so die Herabregulation von Vinexin- β gegebenenfalls besser detektieren zu können, wurden neue Lysate hergestellt und Vinexin- β mit Hilfe eines Antikörpers und A-Sepharose aus dem Lysat präzipitiert. Auch hier konnte keine überzeugende und allenfalls eine geringe Herabregulation von Vinexin- β auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Da auch hier kein vollständiges Set stabil transfizierter Zellen generiert werden konnte, wurden auch die LNCaP + Vinexin- β -Zellen nicht für weitere Versuche verwendet.

5.1.7.2 Effekte von Tiam1 und Vinexin- β auf die Zellmigration transient transfizierter COS-7-Zellen

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Tiam1 einen Einfluss auf die Migration humaner Karzinomzellen hat. Dabei unterschieden sich die beobachteten Effekte abhängig vom verwendeten Zelltyp und –substrat und der Frage, ob unter den jeweiligen Versuchsbedingungen die Ausbildung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Kontakte möglich war (Hordijk *et al.*, 1997; Sander *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 1999). Da es während der Versuche zu der vorliegenden Arbeit nicht gelungen war, Tumorzelllinien stabil mit Vinexin- β zu transfizieren bzw. die Expression von Vinexin- β in den entsprechenden zu untersuchenden Zellen herunter zu regulieren, wurde der Einfluss von Tiam1 und Vinexin- β auf die Zellmigration in transient transfizierten COS-7-Zellen untersucht. Dazu wurden COS-7-Zellen mit FL-Tiam1 und/oder Vinexin- β co-/transfiziert. Als Kontrolle diente ein leerer Vektor (*mock*). Die Experimente erfolgten im sog. *Transwell*-Migrationsassay (siehe 4.2.5.1). Die poröse Membran der *Transwells* wurde zuvor mit Fibronectin, einem Glykoprotein der ECM, beschichtet. Die Poren der Transwellmembran werden dadurch jedoch nicht verschlossen.

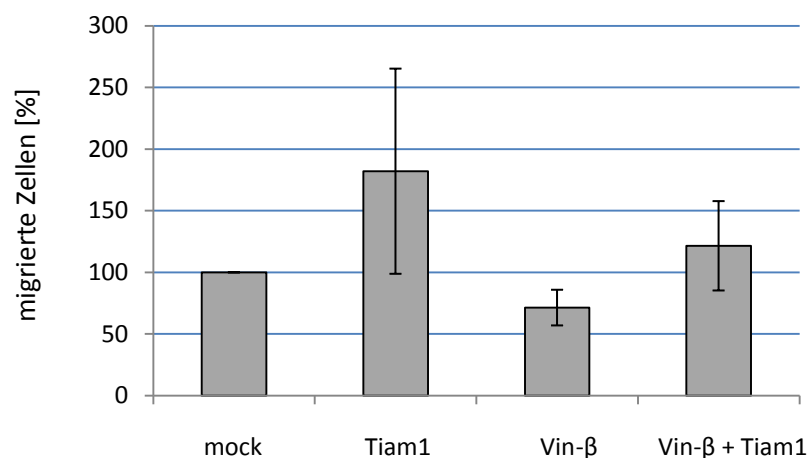
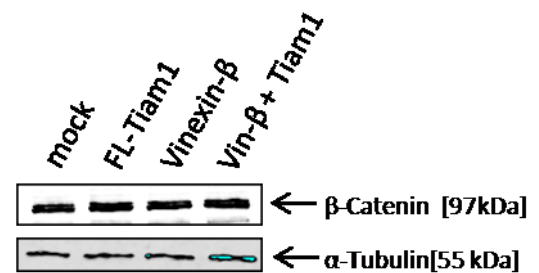


Abb. 5.25: Effekt von Tiam1 und Vinexin- β auf die Zellmigration in COS7-Zellen. Transient mit Tiam1 und Vinexin- β transfizierte COS-7-Zellen wurden 48 h nach Transfektion auf Fibronectin-beschichtete Transwells ausgesät. Die migrierten Zellen wurden nach 2 h mit Methanol fixiert, mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M. (n = 2).

Dabei zeigte sich, dass Tiam1 tendenziell zu einer gesteigerten Migration der COS-7-Zellen führte (Abb. 5.25). Im Gegensatz hierzu führte die Expression von Vinexin- β zu einer leichten aber signifikanten Migrationshemmung. Die Co-Expression von Tiam1 und Vinexin- β resultierte in einer Abnahme der Tiam1-induzierten Migrationssteigerung. Aufgrund der

Effekte von Tiam1 und Vinexin- β auf die Zellmigration wurde zusätzlich die Expression von β -Catenin in den COS-7 Zellen untersucht. Die Expression von β -Catenin spielt eine wichtige Rolle in der intrazellulären Cadherin-vermittelten Adhäsion und Veränderungen in der β -Catenin-Expression deuten auf das Migrationspotential von Zellen hin (Müller *et al.*, 2002).

Abb. 5.26: Immunologischer Nachweis von β -Catenin in COS7-Zellen. Die Zellen wurden mit einem Leervektor, FL-Tiam1, Vinexin- β und Tiam1 + Vinexin- β transient transfiziert. Die Auftrennung für β -Catenin erfolgte über eine 8 % -ige SDS-PAGE. Der Nachweis von β -Catenin im Immunoblot erfolgte mit anti- β -Catenin-Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper. Anschließend wurde die Membran gestrippt und mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert. Die Abbildung ist repräsentativ für n = 2 Versuche.



Die Western Blot-Analyse ergab jedoch, dass weder Tiam1 noch Vinexin- β einen Effekt auf die Expression von β -Catenin haben. Auch nach gemeinsamer Überexpression beider Proteine wurde kein Effekt auf die Expression von β -Catenin beobachtet.

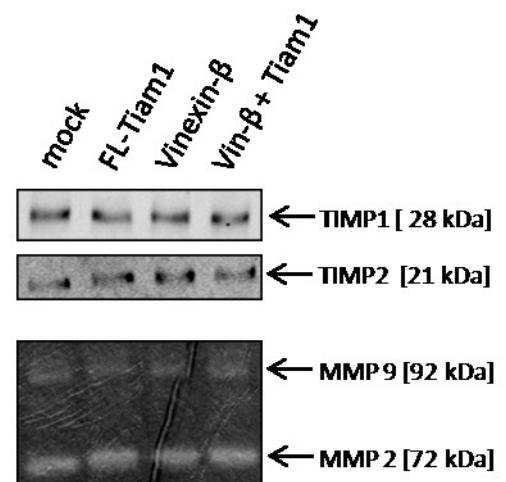
5.1.7.3 Effekte von Tiam1 und Vinexin- β auf die TIMP-1 und -2-Expression und die MMP-Sekretion

Ein entscheidender Schritt bei der Metastasierung ist der Abbau der ECM durch Proteinasen, die auch in verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert werden (Wilson *et al.*, 2004). Die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) -2 und -9 (auch Gelatinasen A und B genannt) scheinen dafür von besonderer Relevanz zu sein. Sie spalten bevorzugt Kollagen vom Typ V, einen der Hauptbausteine der Basalmembran. Eine erhöhte Expression von MMP-2 und -9 geht mit dem metastatischen Potential von Tumorzellen einher (Wang *et al.*, 2008). Inhibiert werden die MMPs durch die *Tissue Inhibitors of Metaloproteinases* (TIMPs). TIMP-1 bindet spezifisch an pro-MMP-9 und TIMP-2 an pro-MMP-2. Erst ein Ungleichgewicht zwischen den den MMPs und TIMPs zugunsten der MMPs in der ECM führt zu Tumorinvasion und –metastasierung.

Bereits in früheren Untersuchungen konnte ein Mechanismus identifiziert werden, über den Tiam1 und Rac in humanen Nieren- und Kolonkarzinomzelllinien zu einer selektiven Hochregulation von TIMP-1 und TIMP-2 führen und so die Invasivität dieser Zellen hemmen

(Engers *et al.*, 2001). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der Effekt von Vinexin- β auf die Sekretion der MMPs sowie von TIMP-1 und -2 untersucht werden. Bislang konnte kein Einfluss von Tiam1 auf die Sekretion von MMP-2 und -9 gezeigt werden. Auch für diese Versuche wurden transient transfizierte COS-7-Zellen eingesetzt. Diese wurden mit FL-Tiam1 und/oder Vinexin- β co-/transfiziert. Als Kontrolle diente auch hier wieder ein leerer Vektor (*mock*). Um die Menge der sezernierten Proteine im Western Blot bestimmen zu können, wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion für 24-48 h mit serumfreien OptiMEM-Medium versetzt. Dabei war darauf zu achten, dass die Zellen eine Konfluenz von mindestens 80 % hatten. Die Sekretion von TIMP-1 und TIMP-2 wurde nach der Aufkonzentration in Ultrazentrifugationsröhrchen im Immunoblot, die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 mittels Zymographie untersucht (siehe 4.2.6).

Abb. 5.27: Einfluss von Tiam1 und Vinexin- β auf die TIMP-1/-2, und die MMP9-/MMP2-Sekretion in COS7-Zellen. Die Zellen wurden mit mock, FL-Tiam1, Vinexin- β und Tiam1 und Vinexin- β transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 h mit OptiMEM versetzt. Die Sekretionslevel von TIMP-1 und -2 wurde durch aufkonzentrierte Überstände im Western Blot untersucht. Die Auftrennung erfolgte über eine 12 % -ige SDS-PAGE. Der Nachweis im Immunoblot erfolgte mit anti-TIMP-1/-2-Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper. Die Sekretionslevel der MMPs 9 und 2 wurden aus denselben Überständen mit Hilfe von Gelatin-Zymographie bestimmt (8 % -iges Gel) (n = 2).



Die Untersuchungen der Sekretionslevel von TIMP-1 und -2 zeigten, dass FL-Tiam1 in COS-7-Zellen nicht zu einer gesteigerten Proteinsekretion von TIMP-1 oder -2 führte. Vinexin- β hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Sekretion von TIMP-1 und -2. Daher war auch bei der Co-Expression beider Proteine kein Effekt zu erwarten. MMP-2 hat in seiner inaktiven Form ein Molekulargewicht von 72 kDa und 66 kDa in seiner aktiven Form. Inaktives MMP-9 ist mit 92 kDa (inaktiv) bzw. 86 kDa (aktiv) etwas größer. Bezüglich der Sekretionslevel der MMPs -9 und -2 zeigte sich in den durchgeführten Versuchen weder für FL-Tiam1 noch für Vinexin- β oder die Kombination beider Proteine ein Effekt. Es konnte weder eine erhöhte Sekretion

der inaktiven Formen noch eine MMP-Aktivierung durch Überexpression von Tiam1 oder Vinexin- β beobachtet werden.

5.2 Untersuchung der Interaktion von Tiam1 und Galectin-1

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die funktionelle Relevanz der Interaktion von Tiam1 und Galectin-1 näher untersucht werden. Auch dieser neue Interaktionspartner von Tiam1 wurde in Vorversuchen zu dieser Arbeit in einem Yeast-Two-Hybrid-Screen mit den N-terminalen 853 AS von Tiam1 identifiziert (Engers *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch hier konnte die Interaktion als spezifisch gewertet werden, da die Kontrollversuche keine β -Galactosidase-Aktivität nach Co-Transformation mit dem Kontrollplasmid und C580-Tiam1 zeigten.

Galectin-1 wird – ähnlich wie Tiam1 auch – mit vielen unterschiedlichen biologischen Prozessen in Verbindung gebracht. U. a. sollen beide Proteine in die Regulation von z. B. Zellwachstum, Entzündung, maligner Transformation, Differenzierung und Metastasierung eingebunden sein (Camby *et al.*, 2006; Itzkowitz *et al.*, 1997). Außerdem wurde am Beispiel unterschiedlicher Zelltypen gezeigt, dass sezerniertes Galectin-1 die Adhäsion dieser Zellen an Matrixproteine wie Laminin oder Fibronectin steigert (Moiseeva *et al.*, 1999; van den Brule *et al.*, 1995; 2003). Ein ähnlicher Effekt, nämlich Steigerung der Zelladhäsion an Laminin sowie Steigerung der Zell-Zell-Adhäsion, konnte interessanterweise auch für Tiam1 in Nierenkarzinomzellen beobachtet werden (Engers *et al.*, 2001).

5.2.1 Nachweis der Bindungsspezifität von Tiam1 und Galectin-1

5.2.1.1 Co-Lokalisation von Tiam1 und Galectin-1 in BA-HAN-1C-Zellen

Wie bereits in Kap. 1.3.3 erwähnt, wird Tiam1 im Rahmen seiner Aktivierung an die Zellmembran gebracht, wo es das sog. *membrane ruffling* - eine morphologisch fassbare Veränderung der Zellmembran - induziert (Michiels *et al.*, 1995). Um zunächst die Bedeutung der Tiam1-Galectin-1-Interaktion näher zu analysieren, wurden eine eventuelle Co-Lokalisation und sich daraus ergebene morphologische Veränderungen in lebenden Zellen untersucht. Dazu wurden BA-HAN-1C-Zellen mit Hilfe von Lipofectamin Reagenz® transient mit den entsprechenden Plasmiden für Tiam1 und/oder Galectin-1 transfiziert bzw. co-transfiziert und anschließend mit dem konfokalen Lasermikroskop analysiert.

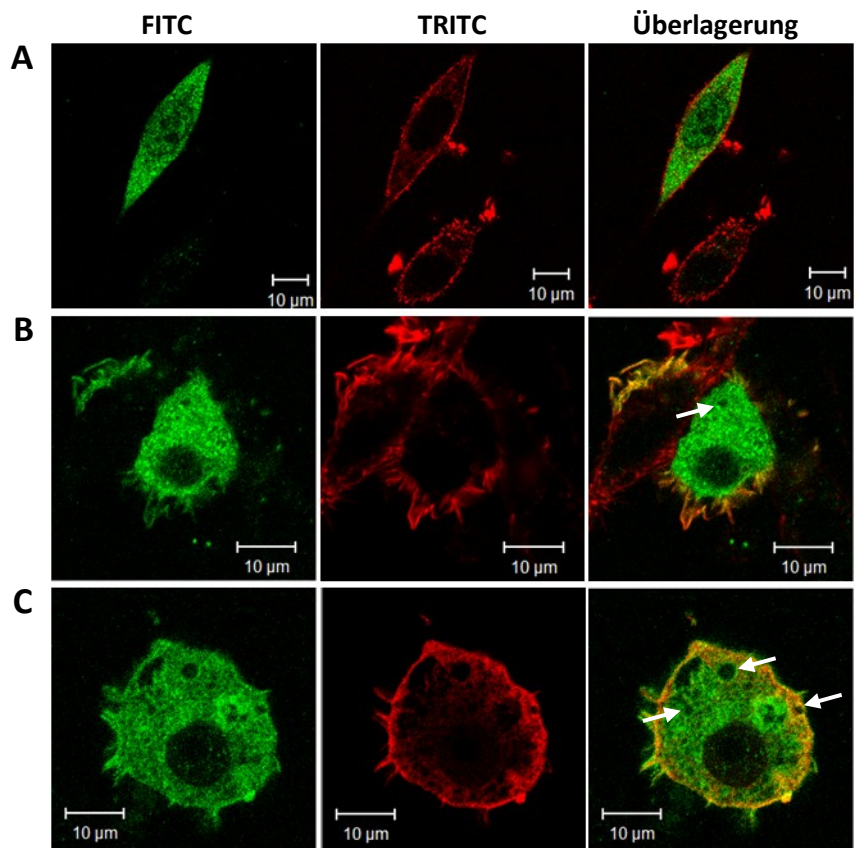


Abb. 5.28: Immunfluoreszenzaufnahmen von Galectin-1 und Tiam1 in BA-HAN-1C-Zellen. BA-HAN-1C-Zellen wurden mit Galectin-1 und Tiam1 jeweils alleine und in Kombination transfiziert, 48 h später mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit Galectin-1- bzw. Tiam1-spezifischen Antikörpern und den entsprechenden FITC- bzw. TRITC-markierten Antikörpern gefärbt. (A) Galectin-1-transfizierte Zelle. Galectin-1 erscheint durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper grün, das Aktin-Cytoskelett durch TRITC-markiertes Phalloidin rot. (B) Tiam1-transfizierte Zelle. Tiam1 erscheint grün, Aktin rot, Überlagerungen durch die Co-Lokalisation von Tiam1 mit dem Aktin-Cytoskelett sind gelb dargestellt. (C) BA-HAN-1C-Zelle nach Co-Transfektion von Tiam1 (grün) und Galectin-1 (rot). Die Überlagerungen von Tiam1 und Galectin-1 im Bereich der Zellmembran fluoreszieren gelb. Die Pfeile demonstrieren exemplarisch die Tiam1-charakteristische Vesikelbildung im Cytoplasma der Zellen.

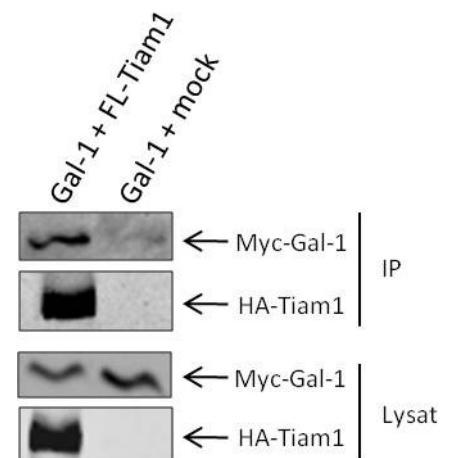
Für Galectin-1 ergab sich klar eine Lokalisation im Cytoplasma und im Kern der Zelle. Der spindelartige Phänotyp der Zelle wurde durch die gesteigerte Galectin-1-Expression nicht modifiziert (Abb. 5.28 A). Tiam1 lokalisierte, wie erwartet, sowohl im Cytoplasma der Zelle, wie auch an der Zellmembran (Abb. 5.28 B). Die Überlagerung von Tiam1 mit dem Cytoskelett im Bereich der Membrankräuselungen erschien in gelb. Wie erwartet, induzierte Tiam1 auch hier ausgeprägtes *membrane ruffling* und einen „pfannkuchenartigen“ Phänotyp der Zelle. Nach einer Co-Transfektion von Tiam und Galectin-1 wurde die Interaktion beider Proteine im Bereich der Zellmembran deutlich sichtbar (Abb. 5.28 C, gelb zeigt die Überlagerung, d.h. die Co-Lokalisierung beider Proteine). Der durch Tiam1 induzierte Phänotyp bleibt erhalten und wird durch die Expression von Galectin-1 weder inhibiert noch

gesteigert. Auch diese Ergebnisse wiesen also deutlich auf eine Interaktion beider Proteine in Zellen hin.

5.2.1.2 **Co-Immunopräzipitation von Tiam1 und Galectin-1**

Nachdem auch für Galectin-1 und Tiam1 auf zytologischer Ebene eine Co-Lokalisation nachgewiesen werden konnte, sollte die Interaktion auf biochemischer Ebene verifiziert werden. Für den Nachweis wurden *in-vitro*-Bindungsanalysen über Antikörper-Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Dazu wurden COS-7-Zellen mit Galectin-1 und FL-Tiam1 oder einem leeren Vektor (*mock*) co-transfiziert. Dieser diente als Kontrolle, um eine unspezifische Bindung auszuschließen. Alle Konstrukte befanden sich bereits in einem pMT2SM-Expressionsvektor. 48 -72 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Im Anschluss daran wurde Tiam1 mit Hilfe eines HA-Antikörpers präzipitiert. Der Präzipitationserfolg sowie die gelungene Transfektion wurden anschließend im Western Blot überprüft.

Abb. 5.29: Immunologischer Nachweis der Wechselwirkung von Galectin-1 und Tiam1 in COS7-Zellen. Cos-7-Zellen wurden mit Myc-Galectin-1 und einem Leervektor bzw. FL-Tiam1 transient co-transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und Tiam mit einem HA-Antikörper aus dem Lysat präzipitiert. Die Analyse für co-präzipitiertes Galectin-1 sowie die Transfektionskontrolle erfolgte über eine 12 % -ige SDS-PAGE und anti-Myc-Antikörper. Tiam1 wurde im Western Blot über eine 8 % -ige SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch mit anti-HA-Antikörper nachgewiesen. Die Abbildung repräsentiert mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche.



Auch wenn der HA-Tag mit < 1 kDa zu klein ist, um ihn bei einer parallelen Auftragung mit FL-Tiam1 (ca. 200 kDa) im selben Western Blot detektieren zu können, so zeigt sich dennoch, dass die Interaktion von Galectin-1 und Tiam1 spezifisch ist, denn nach Co-Transfektion von Tiam1 und Galectin-1 und Präzipitation von Tiam1 konnte Galectin-1 in einem zusätzlichen Western Blot nachgewiesen werden. Es zeigte sich keine unspezifische Bindung von Galectin-1 an, da Galectin-1 in einem zusätzlichen Western Blot immunologisch nicht detektierbar war.

5.2.2 Charakterisierung der Tiam1-Galectin-1-Interaktion

5.2.2.1 Co-Immunopräzipitation von Galectin-1 mit Tiam1-Deletionsmutanten

Im nächsten Schritt sollte nun die für die Interaktion mit Galectin-1 relevante Tiam1-Domäne identifiziert werden. Die hierfür verwendeten Tiam1-Deletionsmutanten sind in Abb. 5.3 exemplarisch dargestellt. In den folgenden Experimenten wurden diese Konstrukte jeweils zusammen mit Myc-Galectin-1 transient in COS-7-Zellen überexprimiert. Als Kontrolle wurde Galectin-1 zusammen mit einem HA-getaggtten Leervektor (*mock*) co-transfiziert. Im Anschluß daran wurde die Bindung von Galectin-1 an die jeweiligen Tiam1-Deletionsmutanten durch Co-Immunopräzipitation untersucht. Die HA-getaggtten Tiam1-Konstrukte wurden mittels HA-Antikörper und Protein-A-Sepharose aus dem Lysat präzipitiert (siehe 4.3.2). Die sich anschließenden Western Blot-Analysen der Gesamtllysate zeigten zunächst die erfolgreiche Transfektion von Galectin-1. Auch alle Tiam1-Deletionsmutanten konnten erfolgreich im Western Blot nachgewiesen werden (ohne Abb.).

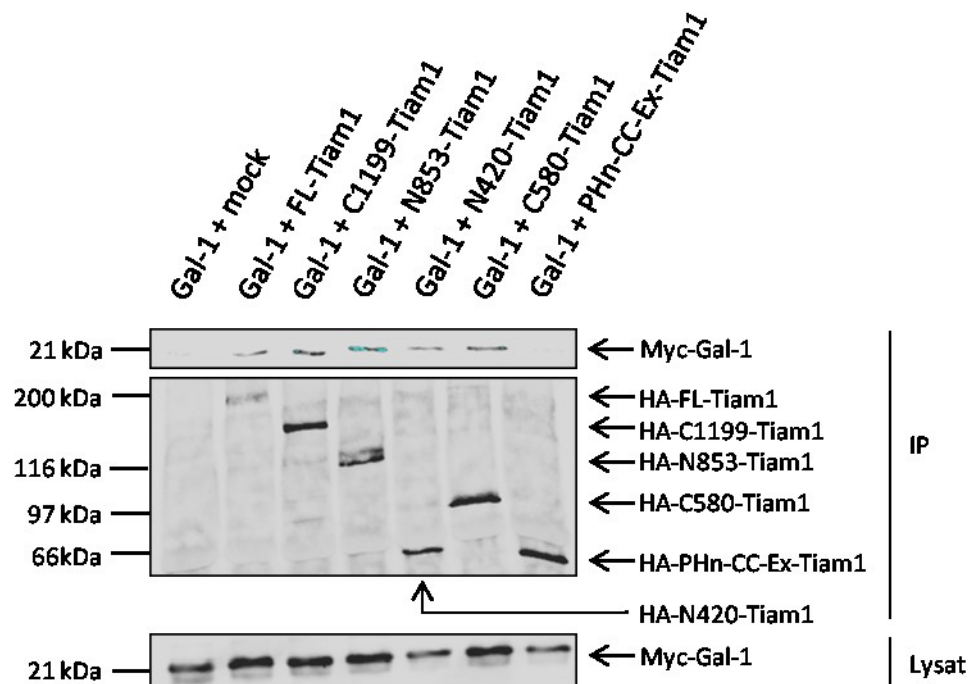


Abb. 5.30: Immunologischer Nachweis der Interaktion von Galectin-1 und den Tiam-Deletionsmutanten. In COS-7-Zellen wurde Myc-Galectin-1 zusammen mit den HA-getaggtten Tiam1-Deletionsmutanten und HA-*mock* co-transfiziert. Galectin-1 wurde über eine 12 % -ige SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch über seinen Myc-Tag detektiert. *Mock*, FL-Tiam1 und die Tiam1-Deletionsmutanten wurden über ihren HA-Tag aus dem Lysat präzipitiert und ebenfalls über den Tag immunologisch nachgewiesen. Die Auftrennung der Konstrukte erfolgte über eine 8 % -ige SDS-PAGE (IP: Immunopräzipitation).

In den Analysen der Co-Immunopräzipitation konnte auch in diesem Versuch die Interaktion von Galectin-1 mit FL-Tiam1 bestätigt werden. Die Co-Transfektion von Galectin-1 mit der N853-Deletionsmutante von Tiam1 zeigte ebenfalls eine Interaktion beider Proteine nach der Co-IP. Dieses Konstrukt wurde bei der Suche nach neuen Interaktionspartnern von Tiam1 im Y2H eingesetzt. Galectin-1 konnte auch mit C580-Tiam1 co-präzipitiert werden. Dieses Konstrukt zeigte mit Galectin-1 im Y2H keine Galaktosidaseaktivität und galt daher als interne Negativkontrolle innerhalb der Präzipitationsversuche. Um diese vermeintlich unspezifische Bindung von Galectin-1 zu korrigieren, wurden die Präzipitationsversuche unter verschiedenen Pufferbedingungen, mit unterschiedlichen Antikörpern und mit variablen Inkubationszeiten bzgl. der Antikörper und der Sepharose durchgeführt. Dieses Bindungsverhalten von Galectin-1 an C580-Tiam1 war aber reproduzierbar. Die Abbildung 5.30 zeigt außerdem die Interaktion von Galectin-1 mit C1199-Tiam1 und N420-Tiam1. An die funktionell besonders interessante PHn-CC-Ex-Domäne von Tiam1 konnte keine Bindung von Galectin-1 nachgewiesen werden.

5.2.2.2 **Co-Lokalisation von Galectin-1 und Tiam1-Deletionsmutanten in BPH-Zellen**

Parallel zu den in 5.2.2.1 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** durchgeführten Versuchen sollte die Interaktion von Galectin-1 an Tiam1 auch in Zellen untersucht werden. Dazu wurden BPH-Zellen (benigne Prostatazellen) transient mit Galectin-1 und den zur Verfügung stehenden HA-getaggten Tiam1-Deletionsmutanten mittels SuperFect®-Transfektionsreagenz co-transfiziert. Zur Kontrolle wurde ein HA-getaggtter leerer Vektor zusammen mit Galectin-1 co-transfiziert. Im Anschluß daran wurden die Zellen mit Antikörpern, die gegen die jeweiligen *Tags* gerichtet waren und den entsprechenden Sekundärantikörpern gefärbt und mittels konfokalen Fluoreszenzmikroskops untersucht. In Abbildung 5.31 sind die Aufnahmen der FITC- und TRITC-vermittelten Fluoreszenzen für Galectin-1 und Tiam1 sowie die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale dargestellt. Es wurde auch hier nicht nur die Co-Lokalisation beider Proteine und ihre Verteilung innerhalb der Zelle untersucht, sondern auch der Einfluss auf den durch Tiam1 induzierten Phänotyp mit ausgedehntem *membrane ruffling* und Vesikelbildung im Cytoplasma. Nach Co-Transfektion von Galectin-1 mit dem leeren Vektor (*mock*) war Galectin-1 diffus im Cytoplasma der Zelle lokalisiert. Die vermeintliche Überlagerung war durch die starke Expression nach der transienten Transfektion zu erklären und war als Hintergrund zu werten. Die Morphologie der BPH-Zellen ist eher rundlich, so dass sich kein möglicher Einfluss von

Galectin-1 auf die Morphologie der Zelle ergab. Nach Co-Transfektion von Galectin-1 mit FL-Tiam ergab sich eine Co-Lokalisation beider Proteine im Cytoplasma. FL-Tiam1 induzierte im Vergleich zum leeren Vektor ein ausgeprägtes *membrane ruffling*. Die Co-Lokalisation von FL-Tiam1 und Galectin-1 war zudem auch in den *membrane ruffles* lokalisiert. Eine verstärkte Vesikelbildung im Cytoplasma konnte in diesem Zelltyp nicht näher beobachtet werden. Galectin-1 hatte keinen Einfluss auf das *membrane ruffling* der Zelle. Die Ergebnisse belegten somit die Interaktion von Galectin-1 und Tiam1 in Zellen und dass Galectin-1 keinerlei Einfluss auf den Tiam1-induzierten Phänotyp der Zelle hat. Die Co-Transfektion von Galectin-1 mit der konstitutiv aktiven C1199-Deletionsmutante von Tiam1 ergab ebenfalls eine Co-Lokalisation beider Proteine im Cytoplasma und an den Tiam1-induzierten Membrankräuselungen der Zellmembran. Im Vergleich zu FL-Tiam1 erschien das *membrane ruffling* jedoch weniger ausgeprägt. Im Gegensatz dazu konnte aber eine stärkere Vesikelbildung durch C1199-Tiam1 beobachtet werden. Die Co-Transfektion von Galectin-1 mit N853-Tiam1 zeigte einen veränderten Phänotyp der Zellen im Vergleich zum leeren Vektor und auch im Vergleich zu FL- und C1199-Tiam1. Da Galectin-1 bisher keinerlei morphologische Veränderung in den Zellen bewirkt hatte, war anzunehmen, dass der veränderte Phänotyp der Zelle durch N853-Tiam1 induziert wurde. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten zudem kein *membrane ruffling* und keine Vesikelbildung im Cytoplasma. N853-Tiam1 lag sowohl membranständig, als auch cytoplasmatisch in der Zelle vor und die Co-Lokalisation mit Galectin-1 zeigte sich ebenfalls gleichmäßig über beide Zellkompartimente verteilt. Die Co-Transfektion von C580-Tiam1 mit Galectin-1 deutete auf eine Co-Lokalisation beider Proteine im Cytoplasma hin. Da bei der C580-Tiam1-Deletionsmutante die für die Membrantranslokation verantwortliche PHn-CC-Ex-Domäne fehlt, war das Protein eher diffus im Cytoplasma der Zelle verteilt. Der Phänotyp der Zelle erschien ähnlich wie nach Transfektion mit C1199-Tiam1. In einem weiteren Ansatz wurde Galectin-1 zusammen mit der N420-Tiam1-Deletionsmutante co-transfiziert. Die Expression beider Proteine deutete auf eine Co-Lokalisation im Cytoplasma und an der Zellmembran hin. Da Galectin-1 bisher wenig bis keinen Einfluss auf die Morphologie der transfizierten Zellen hatte, wurde die Induktion eines spindelartigen Phänotyps der Zelle wahrscheinlich durch N853-Tiam1 vermittelt. Nach Co-Transfektion von Galectin-1 mit der PHn-CC-Ex-Domäne zeigte sich eine Co-Lokalisation beider Proteine eher im Bereich der

Zellmembran. Ein durch PHn-CC-Ex ausgelöstes *membrane ruffling* konnte nicht beobachtet werden.

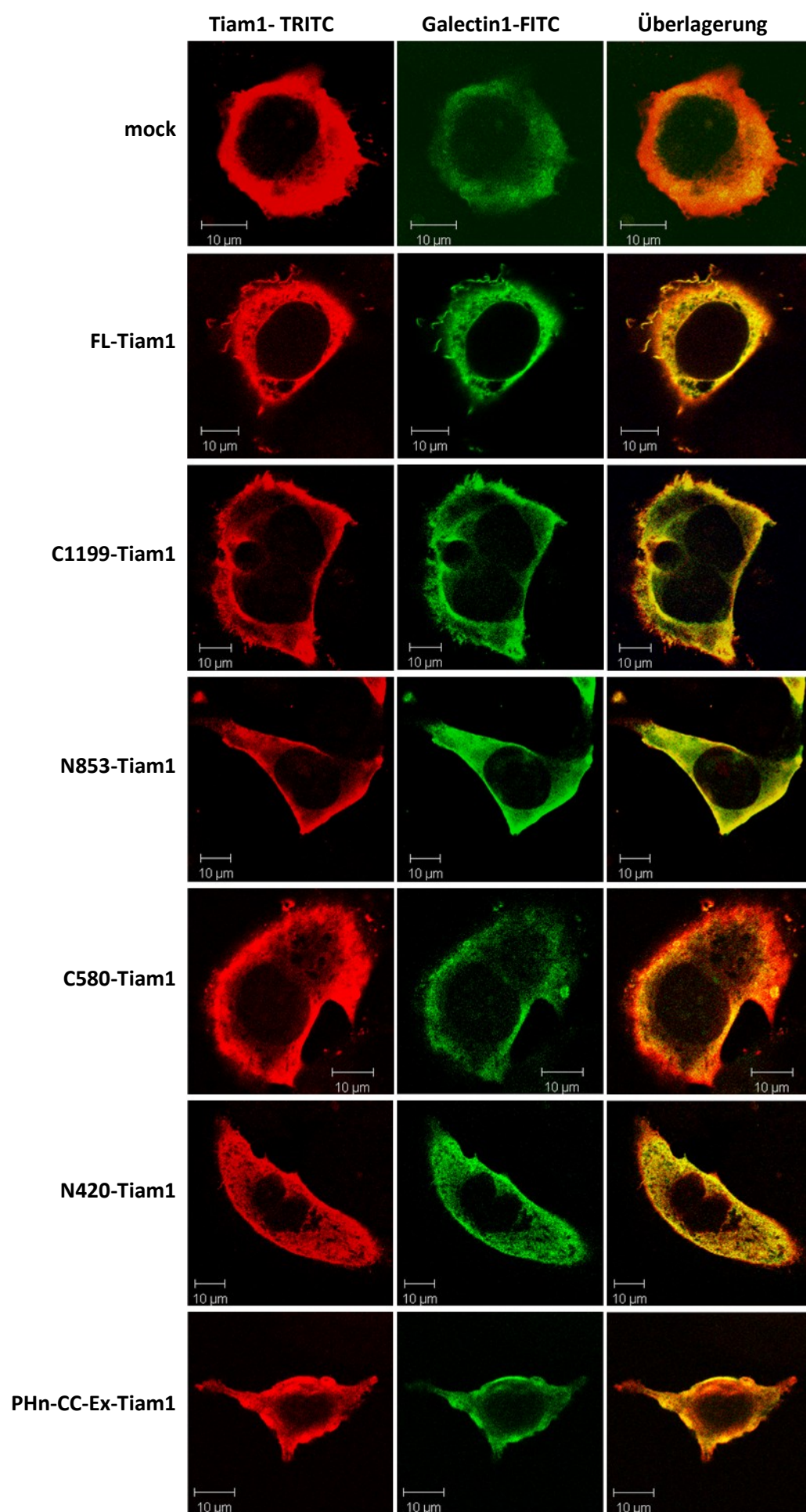


Abb. 5.31: Intrazelluläre Co-Lokalisation von Galectin-1 und verschiedenen Tiam1-Deletionsmutanten. Immunfluoreszenzaufnahmen von BPH-Zellen nach transienter Transfektion mit Galectin-1 und Tiam1-Deletionsmutanten. Das transfizierte Galectin-1-Konstrukt verfügt über einen Myc-Tag und wurde daher mit einem myc-Antikörper und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Die Tiam1-Konstrukte sind mit einem HA-Tag versehen und konnten so durch einen HA-Antikörper und einen TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt werden. Überlagerungen von grün (FITC) und rot (TRITC) sind in gelb dargestellt.

5.2.3 Einfluss von Galectin-1 und EGF auf die Tiam1-Ras-Interaktion

Ähnlich wie Tiam1 bindet auch Galectin-1 vornehmlich an H-Ras-GTP bzw. konstitutiv aktives H-Ras G12V (Paz *et al.*, 2001). Galectin-1 steigert dabei insbesondere die Membranassoziation von Ras, was nachfolgend über eine Aktivierung von ERK zur onkogenen Transformation in 293T-Zellen führt (Paz *et al.*, 2001). Zudem verlängert Galectin-1 die EGF-induzierte Aktivierung von Ras und lenkt den nachgeschalteten Signalweg selektiv in Richtung ERK, während die Ras-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase gehemmt wird (Elad-Sfadia *et al.*, 2002). Hier sollte daher untersucht werden, ob Galectin-1 die Tiam1-Ras-Interaktion beeinflusst und somit auch wesentliche Funktionen von Tiam1 und Ras regulieren könnte. Zum anderen könnte der Aktivitätszustand von Ras darüber entscheiden, ob Galectin-1 und Tiam1 aneinander binden. Um den Einfluss von Galectin-1 auf die Tiam1-Ras-Interaktion zu untersuchen, wurden FL-Tiam1 entweder alleine oder in Kombination mit Galectin-1 in COS-7- und HEK293-Zellen in einem Doppelansatz transient überexprimiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h mit 0,5 % FCS behandelt. Danach wurde einer der Ansätze für 5 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Diese Stimulation sollte zu einer Aktivierung von Ras führen (Elad-Sfadia *et al.*, 2002). Die erfolgreiche Transfektion der transient transfizierten Konstrukte wurde in Western Blot-Analysen überprüft. Die Aktivierung von Ras wurde durch ein Ras-spezifisches Aktivitätsassay untersucht (siehe 4.3.3). Außerdem wurde die Co-Präzipitation von Tiam1 an Ras unter den jeweiligen Versuchsbedingungen analysiert. Galectin-1 zeigte in Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp unterschiedliche Effekte auf die Tiam1-Ras-Interaktion. In COS-7-Zellen hatte Galectin-1, sowohl unstimuliert als auch nach EGF-Stimulation, einen hemmenden Effekt auf die Tiam1-Ras-Bindung (Abb. 5.3 A). EGF-Stimulation alleine führte ebenfalls zu einer Hemmung der Bindung von Tiam1 an Ras-GTP. Auch in HEK293-Zellen war nach EGF-Stimulation eine leichte Hemmung der Tiam1-Ras-Interaktion zu beobachten (Abb. 5.33 B). Galectin-1 führte jedoch, im Gegensatz zu dem Effekt in COS-7-Zellen, hier zu einer

deutlichen Steigerung der Tiam1-Ras-Interaktion. Diese zusätzliche Bindungsinduktion zeigte sich unabhängig von der Stimulation der HEK293-Zellen durch EGF.

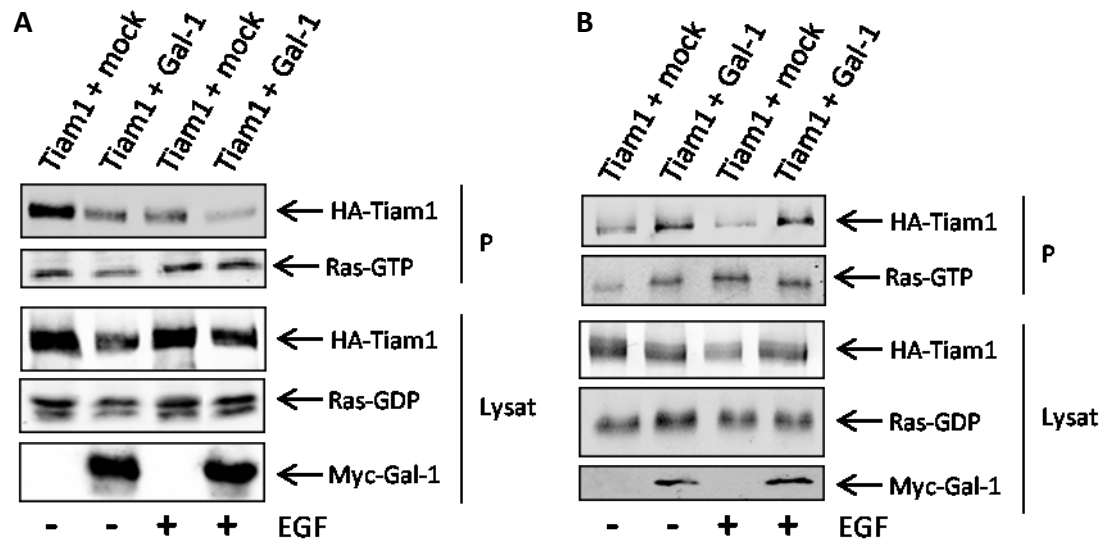


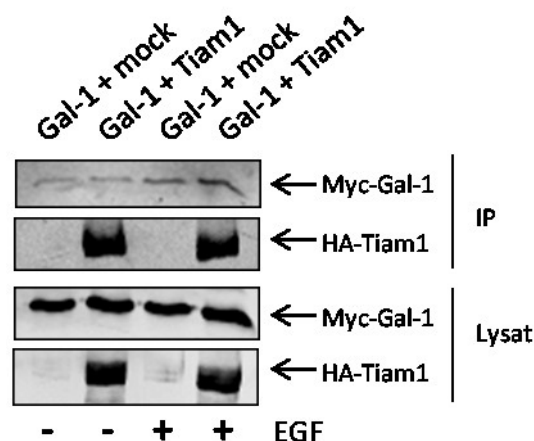
Abb. 5.32: Einfluss von Galectin-1 und EGF auf die Tiam1-Ras-Interaktion in Cos-7- (A) und HEK293- (B) Zellen. Die Zellen wurden mit HA-Tiam und Galectin-1 bzw. einem Myc-Leervektor co-transfiziert. 24 h später erfolgte ein Serumentzug für weitere 24 h bevor die Zellen für 10 min mit EGF [100 ng/ml] behandelt wurden. Die Co-Präzipitation von Tiam1 an Ras-GTP erfolgte über einen *PullDownAssay* von Ras-GTP an die Ras-bindende-Domäne (RBD) von Raf. Der immunologische Nachweis der präzipitierten Proteine (P) erfolgte mit anti-HA-Antikörper für Tiam1 bzw. anti-Ras-Antikörper. Die Expression der Proteine im Lysat wurden ebenfalls mit anti-HA-, anti-Ras- und für Galectin-1 mit anti-Myc-Antikörper nachgewiesen. Die dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für jeweils 3 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

5.2.4 Einfluss von EGF auf die Tiam1-Galectin-1-Interaktion

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob der Aktivitätszustand von Ras Einfluss auf das Bindungsverhalten von Tiam1 und Galectin-1 hat. Analog zu dem in 5.2.3 beschriebenen Versuch wurden die Zellen transfiziert und behandelt, bevor die Lysate für zwei Stunden mit 2 µg anti-HA-Antikörper [0,2 µg/µl] rotierend inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von Protein-A-Sepharose für weitere zwei Stunden. So konnten HA-getaggtes Tiam1 und Galectin-1 aus dem Lysat co-präzipitiert werden. Die sich anschließenden Western Blot-Analysen der totalen Lysate und der Co-IP zeigten zunächst die erfolgreiche Co-Transfektion von FL-Tiam1 mit Galectin-1. Zudem konnte auch in diesem Versuch die Interaktion von Galectin-1 mit FL-Tiam1 bestätigt werden. Die präzipitierten Galectin-1-Banden in den Kontrollen sind wahrscheinlich auf wenig stringente Waschschriffe zurückzuführen. Das detektierte Signal in den Kontrollen war als Hintergrund zu werten und muss bei der

Auswertung berücksichtigt werden. Dennoch zeigte sich innerhalb der durchgeführten Versuche, dass die Interaktion von Tiam1 und Galectin-1 durch die Stimulation des EGF-Rezeptors tendenziell gesteigert wurde.

Abb. 5.33: Einfluss von EGF auf die Tiam1-Galectin-1-Interaktion. COS-7-Zellen wurden mit Myc-Galectin-1 und HA-Tiam bzw. einem HA-Leervektor (mock) co-transfiziert. Die Behandlung mit EGF [100 ng/ml] erfolgte 48 h nach der Transfektion für 10 min bei 37°C. Die Co-Präzipitation von Galectin-1 an Tiam1 erfolgte über HA-Antikörper und Protein-A-Sepharose. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mit anti-HA-Antikörper für Tiam1 bzw. anti-Myc-Antikörper für Galectin-1. Die Abbildung repräsentiert 3 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche (IP: Immunopräzipitation)



5.2.5 Einfluss von Tiam1 auf die Sekretion von Galectin-1

Extrazelluläres Galectin-1 steigert die Adhäsion verschiedener Zelltypen an Matrixproteinen wie Laminin oder Fibronectin (Moiseeva *et al.*, 1999; van den Brule *et al.*, 1995; 2003). Für Tiam1 konnte in der Nierenkarzinomzelllinie ClearCa-28 ebenfalls eine gesteigerte Zelladhäsion an Laminin beobachtet werden (Engers *et al.*, 2001). Durch die intrazelluläre Bindung von Tiam1 an Galectin-1 könnte jedoch die Sekretion von Galectin-1 dahingehend beeinflusst werden, dass nur noch wenig Galectin-1 in den extrazellulären Raum sezerniert werden kann. Da die Bindungsanalysen zwischen Galectin-1 und den verschiedenen Tiam1-Deletionsmutanten (siehe 5.2.2) nur zu einem schwer zu interpretierenden Ergebnis geführt haben, sollte in diesem Versuchsansatz ein „indirektes“ Domänenmapping durchgeführt werden. Davon ausgehend, dass die Bindung zwischen FL-Tiam1 und Galectin-1 in einer Beeinflussung der Sekretion von Galectin-1 resultiert, sollte eine spezifische Bindung an eine der Deletionsmutanten ebenso Einfluss auf die Galectin-1-Sekretion in den extrazellulären Raum nehmen. Für den Versuch wurden COS-7-Zellen transient mit Myc-Galectin-1 und den verschiedenen Tiam1-Konstrukten bzw. einem leeren Vektor co-transfiziert. Um die Menge des sezernierten Galectin-1 bestimmen zu können, wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion für 24-48 h mit dem Serum-reduzierten OptiMEM-Medium versetzt. Die Überstände wurden anschließend für 45 min bei 4°C in Amicon-Röhrchen aufkonzentriert

und anschließend im Western Blot analysiert. Parallel wurde der Erfolg der Transfektion ebenfalls im Western Blot untersucht.

Dabei konnte nach Co-Transfektion von C1199-, N853-, N420- und PHn-CC-Ex-Tiam1 mit Galectin-1 eine gesteigerte Sekretion von Galectin-1 in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. FL- und C580-Tiam1 hatten im Vergleich zum Leervektor keinen steigernden oder hemmenden Effekt auf die Sekretion von Galectin-1. Offenbar sind die PHn-CC-Ex-Domäne und der N-Terminus von Tiam1 funktionell wichtige Domänen für die Sekretion von Galectin-1. Galectin-1 wird nicht über den klassischen Golgi-/ER-Signalweg sezerniert. Vielmehr spielen Zelloberflächen-Rezeptoren wie z. B. Glycoproteine eine wichtige Rolle für die unkonventionelle Sekretion von Galectin-1 (Seelenmeyer *et al.*, 2008). Die PHn-CC-Ex-Domäne von Tiam1 ist wichtig für die Membrantranslokation des Proteins und könnte eine Rolle dabei spielen, Galectin-1 intrazellulär in räumliche Nähe zur Plasmamembran zu bringen, um so die Sekretion von Galectin-1 zu erleichtern.

Rotblat *et al.* generierten eine dominant negative Galectin-1-Substitutionsmutante Galectin-1(L11A) (2004). Diese Mutation machte aus dem positiven H-Ras-Regulator Galectin-1 ein stark interferierendes Protein, das zwar noch in der Lage ist mit aktivem H-Ras zu interagieren, jedoch die Stabilität von aktivem Ras an der Membran deutlich verringert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Ras und Galectin-1(L11A) zwar im Cytoplasma besteht, jedoch nicht an die Plasmamembran transloziert, wie es bei der Interaktion von Ras mit Galectin-1 der Fall ist (Rotblat *et al.*, 2004). Um den Effekt der verschiedenen Tiam1-Konstrukte auf die Sekretion von Galectin-1 weiter zu untersuchen, wurde die Substitutionsmutante Galectin-1(L11A) zusammen mit den verschiedenen Tiam1-Deletionsmutanten in COS-7-Zellen co-transfiziert. Auch hier wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion für 24-48 h mit OptiMEM-Medium versetzt und die Überstände anschließend für 45 min bei 4°C in Amicon-Röhrchen aufkonzentriert.

Keine der mit Galectin-1(L11A) co-transfizierten Tiam1-Deletionsmutanten konnte die Sekretion von Galectin-1(L11A) induzieren. Die zur Kontrolle transfizierte Myc-Galectin-1-Kontrolle konnte jedoch weiterhin im Überstand nachgewiesen werden.

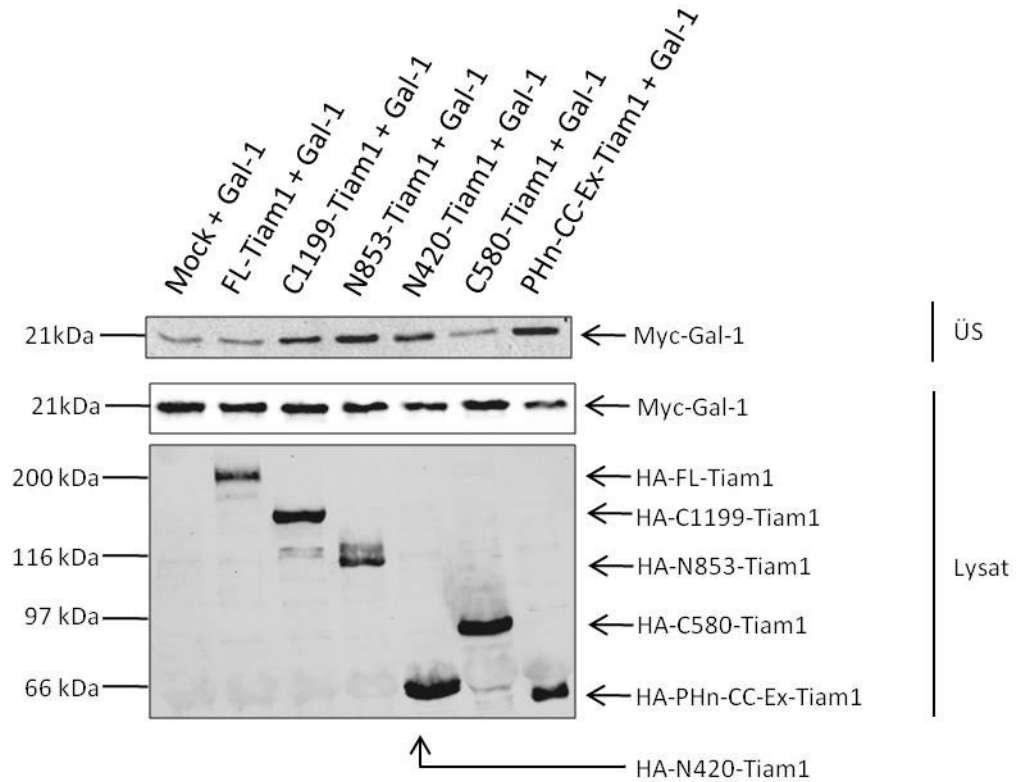


Abb. 5.34: Effekt von Tiam1-Deletionsmutanten auf die Sekretion von Galectin-1 in COS-7-Zellen. Cos-7-Zellen wurden mit Myc-Galectin-1 und den verschiedenen Tiam1-Konstrukten transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 h mit OptiMEM versetzt. Die Menge an sezerniertem Galectin-1 wurde durch aufkonzentrierte Überstände (ÜS) im Western Blot untersucht. Die Auftrennung erfolgte über eine 15 % -ige SDS-PAGE. Der Nachweis im Immunoblot erfolgte mit Myc-Antikörper für Galectin-1. Tiam1 wurde über eine 8 % -ige SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit HA-Antikörper detektiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

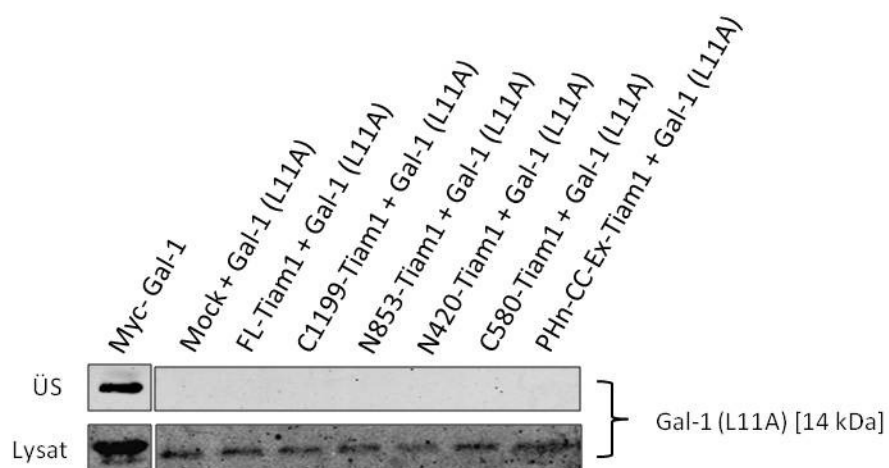


Abb. 5.35: Immunologischer Nachweis von Galectin-1 (L11A). COS-7-Zellen wurden mit Galectin-1(L11A) und den verschiedenen Tiam1-Konstrukten transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 h mit OptiMEM versetzt. Das Sekretionslevel von Galectin-1(L11A) wurde durch aufkonzentrierte Überstände im Western Blot untersucht. Die Auftrennung erfolgte über eine 15 % -ige SDS-PAGE. Der Nachweis

im Immunoblot erfolgte mit anti-Galectin-1-Antikörper für Galectin-1(L11A) Die Ergebnisse sind repräsentativ für n = 2 Versuche.

5.2.6 Einfluss von Galectin-1 auf die Tiam1-vermittelte Rac-Aktivierung

Als Aktivator der GTPase Rac kommt Tiam1 eine wichtige biochemische Bedeutung zu. Da allerdings die Mechanismen, die zur Aktivierung von Tiam1 führen, bisher nicht ausreichend verstanden sind, sollte untersucht werden, ob die Interaktion mit Galectin-1 einen Einfluss auf die Tiam1-induzierte Rac-Aktivierung hat. Dafür wurden HA-FL-Tiam1 und Myc-Galectin-1 alleine oder in Kombination in COS-7- und HEK293-Zellen transient überexprimiert. Ein leerer Vektor (*mock*) und HA-C1999-Tiam1 wurden als interne Kontrollen transfiziert. Die Aktivität von Rac wurde über einen Rac-Aktivitätsassay bestimmt (siehe 4.3.3.) Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in GST-Fish-Puffer lysiert und gleiche Proteinmengen wurden für den Rac-Aktivitätsassay eingesetzt. Die immunologische Expressionskontrolle von Rac-GDP/-GTP, und der transfizierten Konstrukte erfolgte mit kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen die jeweiligen *Tags* bzw. gegen Rac (Abb. 5.36).

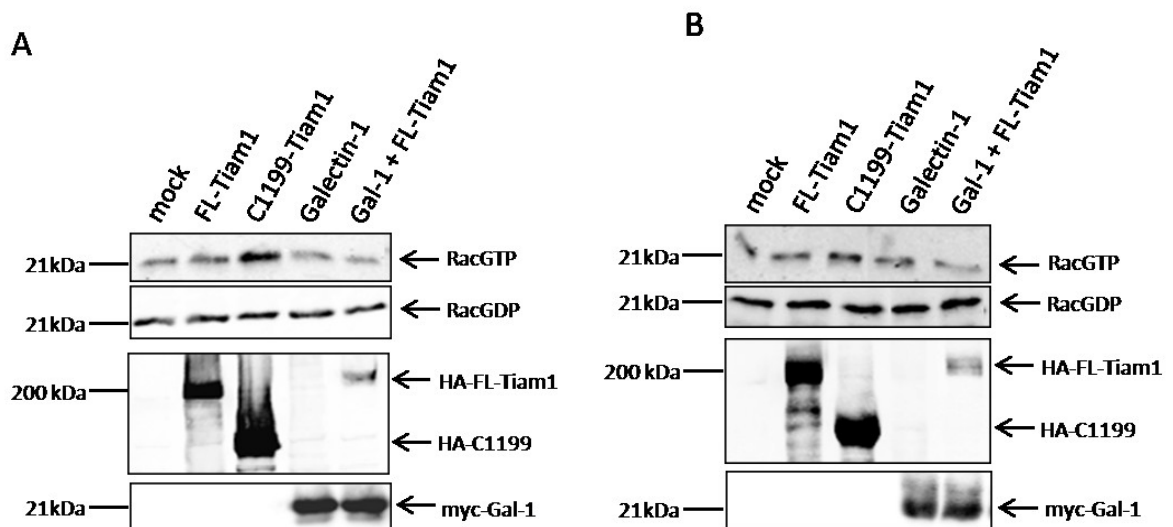


Abb. 5.36: Immunologischer Nachweis von Tiam1, Galectin-1 und Rac in Cos-7- (A) und HEK293-Zellen (B). Die Zellen wurden mit einem Leervektor, HA-FL-Tiam1, HA-C1199-Tiam1 und Galectin-1 transient co-transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate für 2 h mit der rekombinant hergestellten GST-CRIB-Domäne (engl. *Cdc42/Rac Interactive Binding*) des Effektors PAK und für eine weitere Stunde mit GST-Sepharose inkubiert. Über die Bindung an die CRIB-Domäne konnte aktives Rac (=RacGTP)präzipitiert werden. FL- und C1199-Tiam1 wurden in einer 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels eines HA-Antikörpers visualisiert. Der Nachweis von Galectin-1 und Rac erfolgte über einen anti-Myc- bzw. anti-Rac-Antikörper.

Konstitutiv aktives C1199-Tiam1 führte erwartungsgemäß sowohl in COS-7-Zellen als auch in HEK293-Zellen zu einer deutlichen Aktivierung von Rac. In beiden Zellsystemen konnte analog zu den Ergebnissen aus 5.1.6 allenfalls eine schwache Rac-Aktivierung für FL-Tiam1

detektiert werden (Abb. 5.36 A). Galectin-1 hatte jeweils keinen Einfluss auf die Aktivierung von Rac und auch in Kombination mit FL-Tiam1 wurden keine deutlichen Effekte auf die Aktivität von Rac sichtbar. Die geringere Menge an RacGTP war vermutlich auf das schwache Expressionslevel von Tiam1 in den mit Galectin-1 co-transfizierten Ansätzen zurück zu führen.

5.2.6.1 Einfluss von Galectin-1 auf die Rac-vermittelte Signalweitergabe

Rac aktiviert unabhängig voneinander mindestens sechs verschiedene Signalwege (Westwick *et al.*, 1997). Hierfür sind verschiedene Proteinabschnitte bzw. Aminosäuren von Rac verantwortlich (Frost *et al.*, 1996; 1997; Sulciner *et al.*, 1996; Kheradmand *et al.*, 1998; Woo *et al.*, 2000; Engers *et al.*, 2006). Bislang ist jedoch nicht geklärt unter welchen Bedingungen die spezifische Aktivierung der einzelnen Signalwege durch Rac und Tiam1 erfolgt. Unabhängig von den Ergebnissen des Rac-Aktivitätsassays wurde daher auch der Einfluss von Galectin-1 auf die Signalwege unterhalb von Rac untersucht. Auch wenn Galectin-1 nicht zu einer Aktivierung von Rac führte bzw. keinen Einfluss auf die Tiam1-induzierte Rac-Aktivierung hatte, so wäre dennoch ein Einfluss auf die nachgeschalteten Signalwege denkbar, der nicht durch Rac vermittelt wird. Um Aussagen über die Spezifität über verschiedene Zellsysteme hinaus machen zu können, wurden COS-7- und HEK293-Zellen mit den entsprechenden Methoden (siehe 4.2.2) transient transfiziert. Die Zellen wurden mit HA-FL-Tiam1 und/oder Myc-Galectin-1 transient co-transfiziert. FL-Tiam1 wurde, wie die zusätzlichen Kontrollen *mock* und C1199-Tiam auch, für jeden Versuchsansatz nur einmal transfiziert, so dass die entsprechenden Banden in den dargestellten Ergebnissen teilweise mit den dargestellten Banden in den Versuchen für Vinexin- β übereinstimmen.

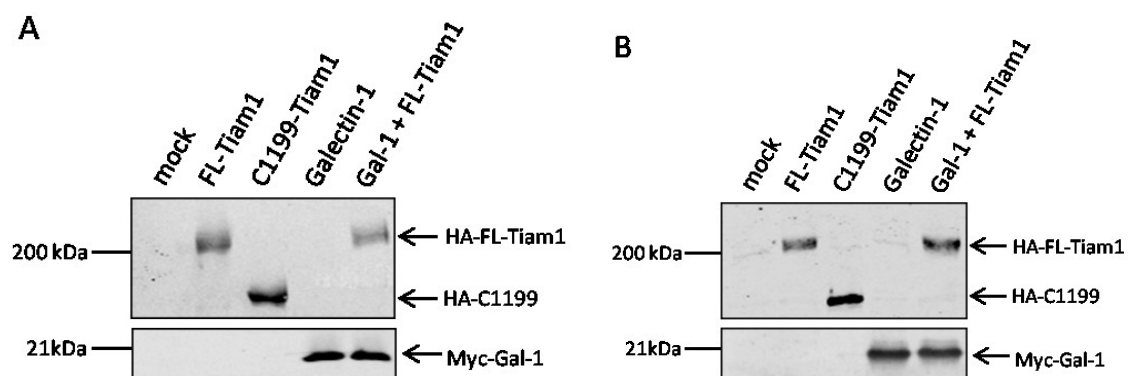


Abb. 5.37: Exemplarischer Expressionsnachweis für FL-Tiam1, C1199-Tiam1 und Galectin-1 nach transienter Transfektion. COS7-Zellen (A) und HEK293-Zellen (B) wurden jeweils mit einem Leervektor, HA-FL-Tiam1, HA-C1199-Tiam1 und Myc-Galectin-1 transient transfiziert. Die Tiam1-Konstrukte wurden über eine 8 % -ige SDS-

PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mittels eines HA-Antikörpers detektiert. Das transfizierte Galectin-1 wurde über eine 12 %-ige SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot durch einen Myc-Antikörper detektiert.

Soweit in den entsprechenden Versuchsansätzen unter 5.2.6.1 nicht anders beschrieben, wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion für weitere 24 h mit reduziertem FCS-Gehalt (0,5 %) im Medium für weitere 24 h kultiviert und im Anschluss daran in eiskaltem Lysepuffer für phosphospezifische Antikörper (siehe 3.4) lysiert. Von einer erfolgreichen Transfektion kann für alle in 5.2.6.1 durchgeführten Experimente ausgegangen werden. Die Abbildung 5.37 zeigt exemplarisch einen Expressionsnachweis der Proteine.

5.2.6.1.1 Regulation von ERK1,2 durch Tiam1 und Galectin-1

Einer der durch Rac selektiv aktivierten Signalwege führt zu einer Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2. Eine Aktivierung von ERK durch Tiam1 wurde bereits in humanen Nieren- und Kolonkarzinomzelllinien gezeigt (Engers *et al.*, 2006). Galectin-1 verlängert die Aktivität von RasGTP und seine Stabilität an der Zellmembran, was nachfolgend zu einer Aktivierung von Raf-1 und ERK führt (Camby *et al.*, 2006).

Daher sollte ein möglicher Einfluss von Galectin-1 auf die Tiam1-induzierte Aktivierung von ERK untersucht werden. Phosphoryliertes ERK wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert.

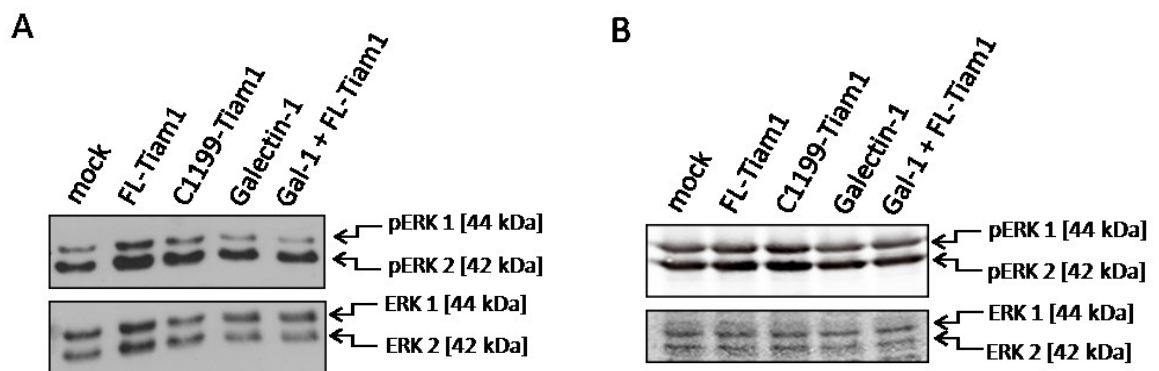


Abb. 5.38: Effekt von Tiam1 und Galectin-1 auf die Aktivierung von ERK. COS-7- (A) und HEK293-Zellen (B) wurden jeweils transient mit einem Leervektor, HA-FL-Tiam1, HA-C1199-Tiam1 und Galectin-1 transfiziert. Der Nachweis für in-/aktives ERK erfolgte über das Odyssey Infrared Imaging System. Dafür wurden gleiche Proteinkonzentrationen in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Phosphoryliertes ERK wurde anschließend durch einen phospho-ERK-Antikörper nachgewiesen. Die Inkubation mit einem ERK-Antikörper erfolgte zeitgleich, da beide Antikörper aus unterschiedlichen Wirten stammen und somit eine Detektion bei unterschiedlichen Wellenlängen erlaubt. Die Abbildung ist repräsentativ für jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Der Western Blot für phosphoryliertes ERK (Abb. 5.38) zeigte, dass unabhängig vom verwendeten Zellsystem weder Tiam1 noch Galectin-1 Effekte auf die Aktivierung von ERK haben. Der Tiam1-Effekt auf die Phosphorylierung von ERK1 in COS-7-Zellen (Abbildung 5.38 A) lässt sich relativieren, da er sich auftragsbedingt auch bei der Detektion von unphosphoryliertem ERK widerspiegelt (vgl. 5.1.6.1.1).

5.2.6.1.2 Regulation der p70S6-Kinase durch Tiam1 und Galectin-1

Tiam1 und Rac regulieren u. a. auch die Aktivierung der p70S6-Kinase (Buchsbaum *et al.*, 2003). Für Galectin-1 ist bislang kein Einfluss auf die p70S6-Kinase beschrieben, jedoch wird die Expression von Galectin-1 über den p70S6-Signalweg gesteuert (Fuertes *et al.*, 2004). Um einen möglichen Einfluss von Tiam1 und Galectin-1 auf die Regulation der p70S6-Kinase zu untersuchen, wurden COS-7- und HEK293-Zellen einzeln oder in Kombination mit HA-Tiam1 und Myc-Galectin-1 transfiziert. HA-C1199-Tiam1 und ein Leervektor wurden zur Kontrolle transfiziert.

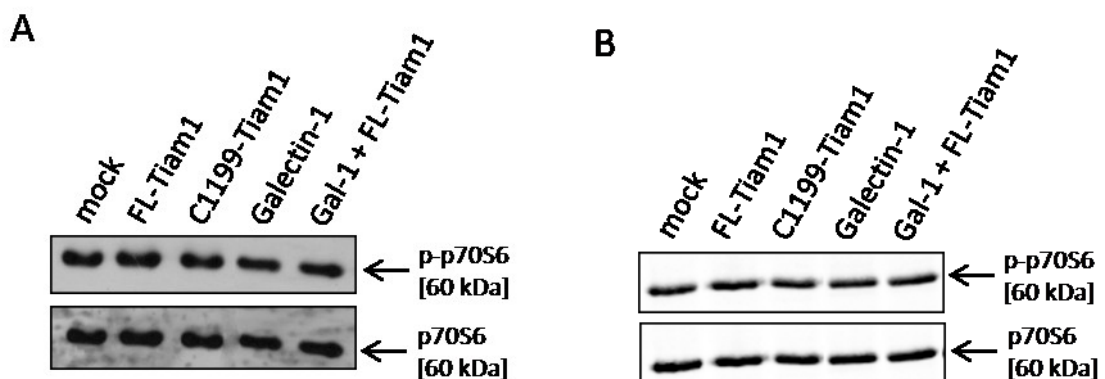


Abb. 5.39: Effekt von Tiam1 und Galectin-1 auf die Aktivierung von p70S6. Der Nachweis für die aktiven und inaktiven Formen der p70S6-Kinase erfolgte sowohl in COS-7- (A) als auch in HEK293-Zellen (B). Dafür wurden die Zellen mit HA-Tiam1 und Myc-Galectin-1 transient transfiziert. Die Lysate wurden über 8 % -ige SDS-Gele aufgetrennt. Die Detektion der aktiven Form erfolgte mit einem phospho-p70S6-Kinase-Antikörper. Anschließend wurde die Membran gestrippt und p70S6 mittels p70S6-Antikörper nachgewiesen. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Die dargestellten Western Blot-Analysen zeigen, dass weder FL-Tiam1 noch die konstitutiv aktive C1199-Tiam1-Deletionsmutante einen Einfluss auf die Aktivierung der p70S6-Kinase hatten. Auch die Transfektion von Galectin-1 zeigte keinerlei Einfluss auf die Aktivierung von p70S6. Weiterhin war bei einer Co-Expression von Tiam1 und Galectin-1 daher kein Effekt auf die Phosphorylierung der p70S6-Kinase zu beobachten.

5.2.6.1.3 Regulation von CyclinD1 durch Tiam1 und Galectin-1

CyclinD1 und auch Tiam1 spielen eine wichtige Rolle für die onkogene Transformation Ras-induzierter Hauttumore im Mausmodell (Malliri *et al.*, 2002; Robles *et al.*, 1998). Für Galectin-1 wurden bislang zelltypabhängige Einflüsse auf Cyclin D1 beobachtet. Während Galectin-1 in der Kolon-Karzinom-Zelllinie HT-29α5 keinen Einfluss auf die Expression von CyclinD1 hat, konnten Lee *et al.* in murinen embryonalen Stammzellen beobachten, dass Galectin-1 die Expression von CyclinD1 signifikant steigerte (Fischer *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2009). Hier sollten die Effekte von Galectin-1 und Tiam1 auf die Aktivierung von CyclinD1 in COS-7- und HEK293-Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit HA-Tiam1 und Galectin-1 co-transfiziert und die Menge an Cyclin D1 im Western Blot nachgewiesen.

Bei diesem Versuch zeigten sich analog zu den Versuchen in 5.1.6.1.3 für FL- und C1199-Tiam1 in Abhängigkeit vom Zellsystem unterschiedliche Einflüsse auf die Expression von CyclinD1. In COS-7-Zellen (Abb. 5.40 A) hatten FL-Tiam1 und C1199-Tiam1 keinen Effekt auf die CyclinD1-Expression. Auch eine Überexpression von Tiam1 zusammen mit Galectin-1 in COS-7-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Menge an CyclinD1 in den Zellen. In HEK293-Zellen verursachte die Expression von FL- bzw. C1199-Tiam1 eine gesteigerte CyclinD1-Expression (vgl. 5.1.6.1.3). Die Expression von Galectin-1 hat allerdings keinen Effekt auf die Expression von CyclinD1.

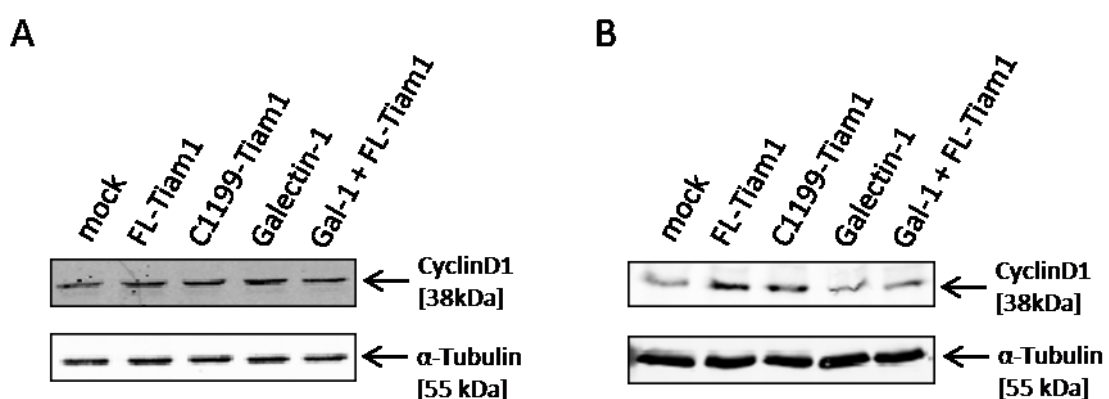


Abb. 5.40: Einfluss von Tiam1 und Galectin-1 auf die Expression von CyclinD1. COS-7- bzw. HEK293-Zellen wurden mit HA-Tiam1 und /oder Myc-Galectin-1 co-transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Trennung der Lysate erfolgte über eine 12 % -ige SDS-PAGE, die Detektion von CyclinD1 mit einem spezifischen Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper. Anschließend wurden die Membranen gestrippt und mit α-Tubulin-Antikörper reinkubiert. (A) zeigt ein repräsentatives Ergebnis für unabhängig voneinander durchgeführte

Versuche in COS-7-Zellen. In (B) ist das repräsentative Ergebnis aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in HEK293-Zellen abgebildet.

5.2.6.1.4 Regulation von NF κ B durch Tiam1 und Galectin-1

NF- κ B reguliert die Transkription verschiedener Gene. Durch seinen Einfluss auf die Apoptose spielt NF- κ B auch eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung und -progression und es konnte gezeigt werden, dass NF- κ B in HeLa-Zellen redox-abhängig durch Rac aktiviert wird (Ross *et al.*, 2004; Sulciner *et al.*, 1996). Die Aktivierung von NF- κ B wird jedoch durch verschiedene Einflüsse stimuliert (Bäuerle & Henkel, 1994). Um den Einfluss der Rac-vermittelten Signalweitergabe in Bezug auf NF- κ B näher bestimmen zu können sollte der Einfluss von Tiam1 und Galectin-1 auf NF- κ B untersucht werden. Die Expression der aktiven Form von NF- κ B (p65) wurde im Western Blot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers analysiert und die Membran mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert.

Die Western Blot-Analysen demonstrierten unabhängig vom verwendeten Zellsystem, dass weder Tiam1 noch Galectin-1 Einfluss auf die Expression von NF- κ B hatten. Die vermeintlichen Unterschiede in der NF- κ B-Expression in der Abbildung 5.41 A waren auf die Schwankungen innerhalb der aufgetragenen Proteinmengen zurück zu führen. Diese hatte in unterschiedlichen Experimenten vermeintlich unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression von NF- κ B, so dass schließlich auch in COS-7-Zellen für Galectin-1 kein Effekt auf die NF- κ B-Expression anzunehmen war.

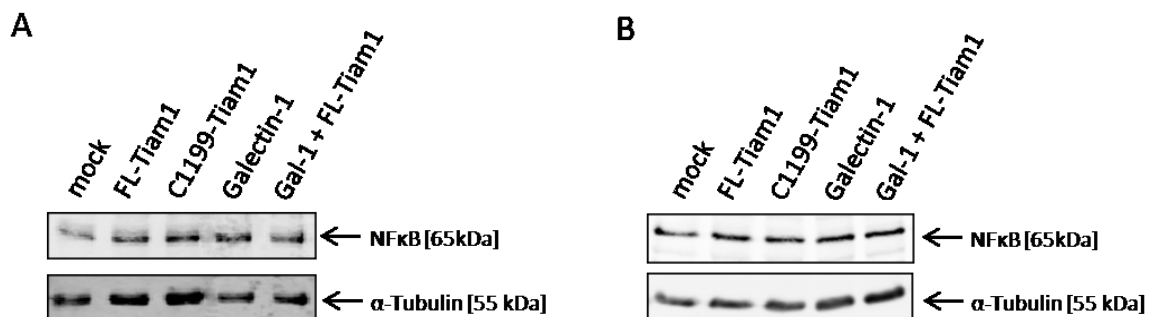


Abb. 5.41: Einfluss von Tiam1 und Galectin-1 auf die Aktivierung von NF- κ B. HA-Tiam1 und Myc-Galectin-1 wurden einzeln oder in Kombination in COS-7- (A) und HEK293-Zellen (B) transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Lysate erfolgte über eine 8 % -ige SDS-PAGE und die Detektion von aktivem NF- κ B erfolgte mit einem spezifischen Antikörper und entsprechendem Sekundärantikörper. Die Membranen wurden im Anschluß gestrippt und mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert. Die Abbildung zeigt die repräsentativen Ergebnisse aus jeweils 2 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

5.2.6.1.5 Selektive ROS-Aktivierung durch Tiam1 und Galectin-1

Die Effekte von Tiam1 und Rac sind zelltypabhängig. Daher sollte innerhalb der Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation untersucht werden, ob die Tiam1/Rac-induzierte ROS-Aktivierung sich auf COS-7-Zellen übertragen lässt und ob auch die Expression von Galectin-1 zu einer gesteigerten ROS-Produktion führt. Dazu wurden die COS-7-Zellen transient mit FL-Tiam und/oder Galectin-1 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C mit 20 µM DCF-DA in DMEM ohne FCS behandelt. Die Messung der ROS erfolgte nach Aufnahme der Zellen in PBS + 0,5 % FCS im Durchflusszytometer. Mit den übrig gebliebenen Zellen wurde die Expression der transfizierten Proteine im Western Blot überprüft.

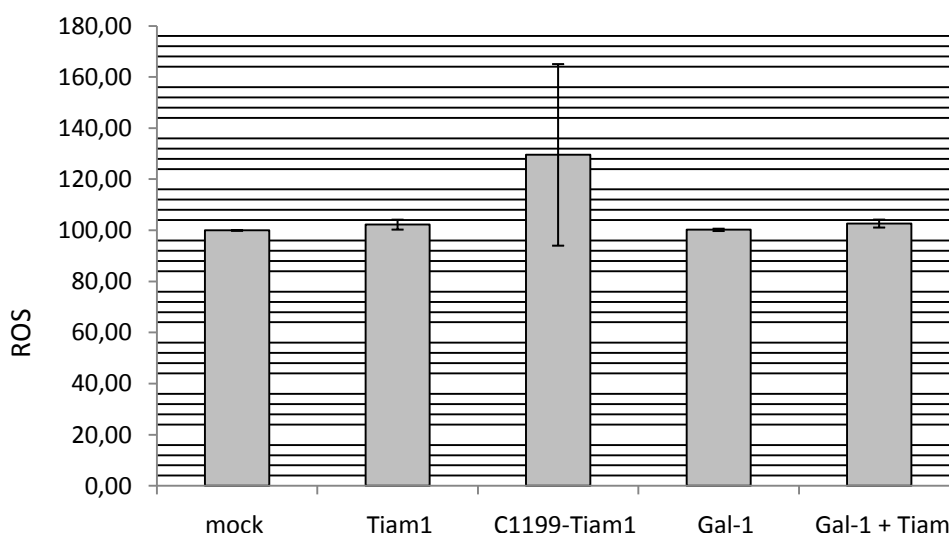


Abb. 5.42: Effekt von Tiam1 und Galectin-1 auf die Bildung von ROS. COS-7-Zellen wurden mit Tiam-1 und Galectin-1 alleine oder in Kombination transfiziert, und 48 h nach der Transfektion für 60 min mit DCF-DA [20 µM] in serumfreien DMEM behandelt. Anschließend wurde die intrazelluläre Fluoreszenz im Durchflusszytometer gemessen. Für die Standardisierung wurde das Fluoreszenzsignal der mock-transfizierten Zellen auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M. (n = 3).

Wie in Abbildung 5.42 zu sehen ist, zeigte FL-Tiam1 keine gesteigerte Aktivierung von ROS im Vergleich zu *mock*. Auch transient transfiziertes Galectin-1 hatte keinen Einfluss auf die Bildung von ROS, weder alleine noch in Kombination mit Tiam1. Lediglich die konstitutiv aktive C1199-Tiam1-Deletionsmutante zeigte einen geringen messbaren Anstieg der ROS-Bildung, der jedoch nicht signifikant war (vgl. 5.1.6.1.5).

5.2.6.1.6 Regulation von Akt durch Tiam1 und Galectin-1

Rac aktiviert in NIH3T3-Zellen auch die Serin/Threonin Kinase Akt (Singh et al., 2004), und auch für die DH-PH-Domänenkombination von Tiam1 konnte in NIH3T3-Zellen bereits eine leichte Aktivierung von Akt gezeigt werden (Wennerberg et al., 2002). Galectin-1 steigert in embryonalen Stammzellen sowohl Akt- als auch mTOR-Phosphorylierung (Lee *et al.*, 2009). Der Effekt von Tiam1 und Galectin-1 auf eine Aktivierung von Akt wurde in COS-7- und HEK293-Zellen untersucht.

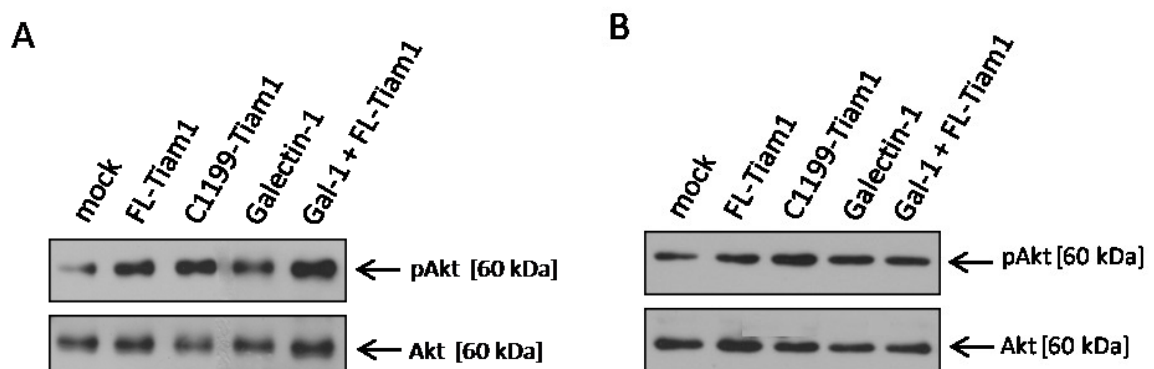


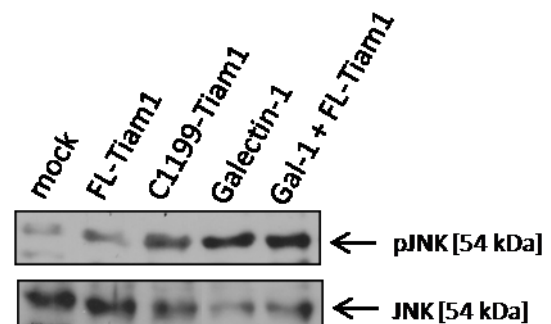
Abb. 5.43: Effekt von Tiam1 und Galectin-1 auf die Aktivierung von Akt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Lysate erfolgte über eine 8 % -ige SDS-PAGE und die Detektion von phospho-Akt erfolgte über einen spezifischen Antikörper und entsprechendem Sekundärantikörper. Die Membranen wurden im Anschluss gestrippt und mit anti-Akt-Antikörper reinkubiert. (A) Repräsentatives Ergebnis für die durchgeführten Versuche in COS-7-Zellen (n=2). (B) Repräsentatives Ergebnis für in HEK293-Zellen durchgeführte Versuche (n=3).

Die Ergebnisse der Abbildung 5.43 zeigen, dass FL-Tiam1 und C1199-Tiam1 in COS-7- und HEK293-Zellen die Phosphorylierung von Akt deutlich steigerten. Für Galectin-1 ergaben sich im Rahmen der Phosphorylierungsanalysen für Akt unterschiedliche und schwierig zu interpretierende Ergebnisse. Die Expression von Galectin-1 hatte keinen deutlichen Effekt auf die Aktivierung von Akt, der sich in den durchgeführten Experimenten konstant beobachten ließ. Daher war für Galectin-1 kein Effekt auf die Phosphorylierung von Akt anzunehmen. Die mit Tiam1 und Galectin-1 co-transfizierten Ansätze zeigten im Vergleich zu FL-Tiam1 zwar eine deutliche Steigerung der Tiam1-induzierten Akt-Phosphorylierung, die sich jedoch auch in den Western Blot-Analysen für inaktives Akt widerspiegelt und sich somit aufhebt. Auch in HEK293-Zellen hatte Galectin-1 keinen deutlichen Effekt auf die Phosphorylierung und somit Aktivierung von Akt.

5.2.6.1.7 Regulation der c-Jun-Kinase durch Tiam1 und Galectin-1

Durch Tiam1-induzierte Rac-Aktivierung führt in COS-7-Zellen zu einer Aktivierung der c-Jun-Kinase (Michiels *et al.*, 1997). Rekombinantes und damit extrazelluläres Galectin-1 induziert die Zellproliferation über die Aktivierung von NF- κ B und z. T. auch über JNK-Aktivierung in PSC-Zellen (Masamune *et al.*, 2006). Ob auch intrazellulär vorkommendes Galectin-1 die Aktivierung von JNK und die Tiam1-induzierten Effekte beeinflusst, wurde im Rahmen dieser Arbeit in COS-7-Zellen untersucht. Die Expression von phosphorylierter JNK wurde im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper analysiert. Die Membran wurde im Anschluss daran gestrippt und mit JNK-Antikörper reinkubiert.

Abb. 5.44: Immunologischer Nachweis von phosphorylierter c-Jun Kinase. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Lysate erfolgte über eine 10 % -ige SDS-PAGE und die Detektion von phospho-JNK erfolgte über einen spezifischen Antikörper und entsprechendem Sekundärantikörper. Die Membranen wurden im Anschluss gestrippt und mit anti-JNK-Antikörper reinkubiert. Für sich zu bewertendes Ergebnis in COS-7-Zellen.



FL-Tiam und C1199-Tiam zeigten in diesem Versuch eine gesteigerte Aktivierung von JNK in Vergleich zum leeren Vektor (*mock*). Die Aktivierung von JNK durch Tiam1 in COS-7-Zellen konnte schon in früheren Experimenten gezeigt werden (Michiels *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Aktivierung jedoch nicht konstant über verschiedene Experimente hinweg belegt werden. Galectin-1 steigerte in diesem Versuch die Aktivierung von JNK und die Co-Expression von Tiam1 und Galectin-1 resultierte ebenfalls in einer Aktivierung von JNK in dem untersuchten Zellsystem. Die Abbildung 5.44 repräsentiert allerdings nur einen einzelnen Versuch und kann daher auch nur für sich genommen interpretiert werden.

5.2.6.1.8 Einfluss von Tiam1 und Galectin-1 auf die cytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂)

Der Einfluss von Tiam1 und Galectin-1 auf die cPLA₂ wurde in einem Luciferase-Reportergen-Assay indirekt über die Aktivierung des SRE-Promotors bestimmt. Dazu wurden COS-7-Zellen mit FL-Tiam1 und/oder Galectin-1, dem SRE-Dimer in einem pA3LUC-Vektor und einem Reportergenkonstrukt für Renilla-Luciferase in pRL-TK-Vektor co-transfiziert. Für diesen Versuch wurde Rac G12V als interne Positivkontrolle verwendet, die zu einer gesteigerten

Aktivierung des SRE-Promotors führen sollte (Kim & Kim, 1997). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und aus den Überständen wurden die Firefly- und Renilla-Luciferase Aktivität bestimmt, sowie der Erfolg der Transfektion in einem Western Blot überprüft. Für jeden Versuch wurde in einem dreifach-Ansatz transfiziert.

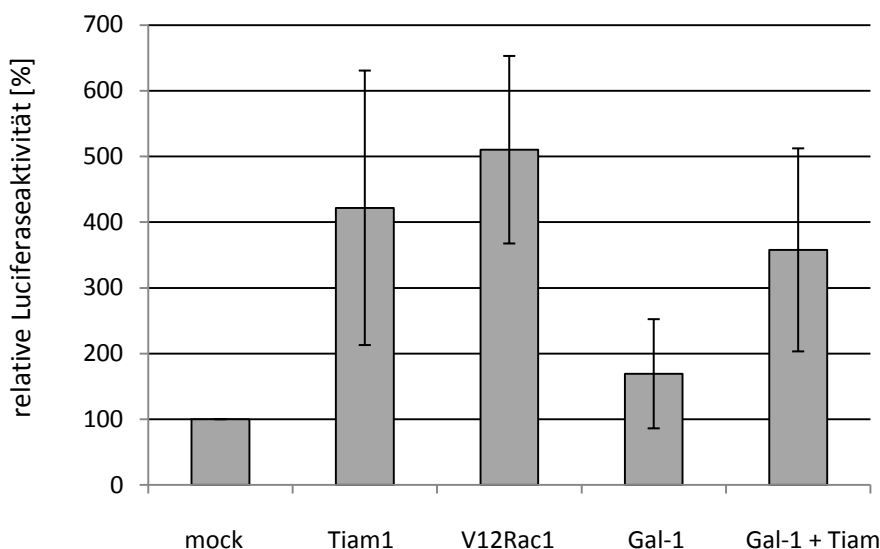


Abb. 5.45: Effekt von Tiam1 und Galectin-1 auf die Aktivierung des SRE-Promotors. Cos-7-Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transient transfiziert und 48 h später mit Hilfe eines Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assays auf die Promotoraktivität des *Serum Response Elements* untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M. von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Rac G12V führte zu einer gesteigerten Aktivierung des SRE. Auch FL-Tiam1 führte zu einer signifikanten Steigerung der Promotoraktivität im Vergleich zu *mock*. Galectin-1 hatte keinen signifikanten Effekt auf die Promotoraktivität. Die Co-Expression von Galectin-1 und Tiam1 zeigte zwar eine geringe Aktivierung des Promotors als Tiam1 alleine aber dieser Effekt kann evtl. durch das geringere Expressionslevel von Tiam1 in den co-transfizierten Ansätzen erklärt werden (vgl. 5.2.6.1). Somit hätte Galectin-1 keinen hemmenden Einfluss auf den Tiam1-Effekt.

5.2.7 Untersuchungen zur funktionellen Relevanz der Tiam1-Galectin-1-Interaktion im Hinblick auf die Regulation der Zellmigration

In eigenen Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit konnten Engers *et al.*, (2001 & 2006) bereits zeigen, dass Tiam1 und Rac in humanen Nieren- (ClearCa-28) und Kolonkarzinomzellen (Dus-Col1B) zu einer signifikanten Hemmung der Invasion und

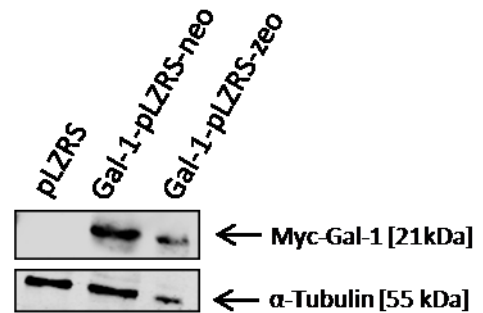
Migration führen. Zudem wurde mit der selektiven Hochregulation von TIMP-1 und -2 ein neuer molekularer Mechanismus identifiziert, über den die Invasivität dieser Zellen durch Tiam1 und Rac gehemmt wird (Engers *et al.*, 2001; 2006). Daher sollte auch der Einfluss von Galectin-1 auf die Sekretion von TIMP-1 und -2 und der MMPs 2 und 9 untersucht werden. Dazu sollten im Rahmen dieser Arbeit o. g. Karzinomzellen zum einen stabil mit Galectin-1 transfiziert bzw. mit konstitutiv aktivem C1199-Tiam1 und Galectin-1 co-transfiziert werden. Zum anderen sollte die Expression von Galectin-1 in den entsprechenden Zelllinien mittels RNA Interferenz (RNAi) herunter reguliert werden. Anschließend sollte mit den neu generierten, stabil transfizierten Zelllinien ein entsprechender Migrationassay durchgeführt werden. Zudem sollte die Sekretion der TIMPs und MMPs beurteilt werden.

5.2.7.1 **Herstellung stabil transfizierter Zelllinien**

5.2.7.1.1 Stabile Transfektion von Myc-Galectin-1-pLZRS-IRESneo/zeo

Für die stabile Transfektion sollten die Karzinomzelllinien DusCol-1B-(Kolon) und clearCa-28-(Niere) Zellen bzw. bereits mit C1199-Tiam1 stabil transfizierte DusCol-1B- und clearCa-28-Zellen genutzt werden. Die Nieren-Karzinomzellen wurden ausgewählt, da die Interaktion von Tiam1 und Galectin-1 durch einen Y2H einer humanen Nieren-cDNA-Bank detektiert wurde. Galectin-1 wurde mit Hilfe der in 3.8.3 aufgeführten Primer anhand der DNA von Myc-Galectin-1-pMT2SM mittels PCR amplifiziert und in pLZRS-IRES-neo/-zeo-Expressionsvektoren kloniert. Diese Vektoren sind wegen ihrer Resistenzgene für Neomycin bzw. Zeocin für die stabile Transfektion geeignet. Der Erfolg der Klonierung wurde anschließend durch Sequenzierung überprüft und die erfolgreiche Expression des Proteins durch transiente Transfektion in COS-7-Zellen bestätigt (Abb. 5.46). Nachdem die erfolgreiche Expression der klonierten Galectin-1-Konstrukte im Western Blot überprüft wurde, sollten im weiteren Verlauf der Arbeit DusCol-1B- und clearCa-28-Zellen bzw. DusCol-1B + C1199-Tiam1- und clearCa-28 + C1199-Tiam1-Zellen mit den generierten Konstrukten stabil transfiziert werden.

Abb. 5.46: Überexpression von Myc-Galectin-1- pLZRS-neo/-zeo in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden transient mit den erfolgreich klonierten Myc-Galectin-1-Konstrukten oder einem leeren pLZRS-Vektor transfiziert. Für den Western Blot wurden jeweils gleiche Proteinmengen der Zelllysate über eine 12 % -ige SDS-PAGE aufgetrennt. Myc-Galectin-1 Myc-Antikörper detektiert werden. Anschließend wurde die Membran gestrippt und zur Kontrolle mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert.



Die Transfektionen wurden, wie für Vinexin- β auch, wiederholt mit verschiedenen Transfektionsreagenzien und auch mit Hilfe von Retroviren durchgeführt. Jeweils 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in entsprechendes Selektionsmedium überführt. In keinem der durchgeführten Ansätze konnte eine erfolgreiche Transfektion und damit stabile Expression von Galectin-1 in den ausgewählten Zellen erreicht werden. Daher wurde für die stabilen Transfektionen die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 ausgewählt. Von diesen Zellen waren bereits transgene PC-3 + C1199-Tiam1-Zellen verfügbar. Um die Untersuchungen für Galectin-1 jedoch auf ein einheitliches Krebsmodell zu beschränken, wurden Zellen ausgewählt in denen auch ein *knockdown* von Galectin-1 möglich ist. Die PC-3-Zellen wurden mit Hilfe von SuperFect-Transfektionsreagenz mit Galectin-1-pLZRS-IRESneo transfiziert. Zusätzlich wurden transgene PC-3 C1199-Tiam1-Zellen mit Myc-Galectin-1-pLZRSzeo transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in Selektionsmedium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen überführt. Jeweils im Laufe der folgenden Wochen konnten über verschiedene Versuchsansätze hinweg resistente PC-3-Myc-Galectin-1 bzw. PC-3 C1199-Tiam1 + Myc-Galectin-1 generiert werden. Diese wurden subkultiviert bis ausreichend Zellen für eine Kryokonservierung (siehe 4.2.1.1) vorhanden waren. Erst im Anschluß daran wurde der Rest der Zellen auf eine erfolgreiche Expression von Galectin-1 getestet. Leider stellte sich dabei immer wieder heraus, dass die Zellen zwar das Plasmid aufgenommen haben und auch die Selektion überlebten, aber eine Überexpression von Galectin-1 konnte weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass die Zellen gegenüber den jeweiligen Antibiotika eine Resistenz entwickelt haben, wurden parallel zu den transfizierten Ansätzen auch untransfizierte PC-3-Zellen unter Selektionsdruck kultiviert. Diese Zellen waren jedoch nach etwa zwei Wochen alle gestorben, so dass eine endogene Resistenz der Zellen ausgeschlossen werden konnte.

5.2.7.2 Klonierung von shRNA für pRETROSUPER für den spezifischen knockdown von Galectin-1

Die stabile Transfektion mit dem shRNA-Expressionsvektor pRETROSUPER sollte durch RNAi dazu führen, dass die Galectin-1 mRNA zerstört und so die Translation des Proteins unterbunden wird. Dafür musste analog zu Vinexin-β zunächst eine spezifische Zielsequenz in der mRNA von Galectin-1 ausgewählt werden. Die Sequenz für den spezifischen *knockdown* von Galectin-1 wurde mit Hilfe des Programms *genelink shRNA Design* ausgewählt (www.genelink.com) und war ⁽³⁹⁷⁾5'- GCUGCCAGAUGGAUACGAA -3'⁽⁴¹⁵⁾. Die Auswahl des Loops erfolgte unter Einbezug der Ergebnisse von McIntyre & Fanning (2006). Die shRNA-codierende Sequenz wurde dann, wie unter 4.1.11.3 beschrieben, in den pRETROSUPER-Vektor kloniert. Parallel dazu wurde eine *scrambled*-shRNA-Kontrolle in pRETROSUPER kloniert, die sich von der shRNA-Sequenz von Galectin-1 durch den Austausch von zwei Basen unterscheidet. Damit sollte die Spezifität der gegen Galectin-1 gerichteten shRNA überprüft werden, denn die Fehlpaarung eines einzelnen Basenpaares sollte die Repression durch RNAi verhindern (Brummelkamp *et al.*, 2002).

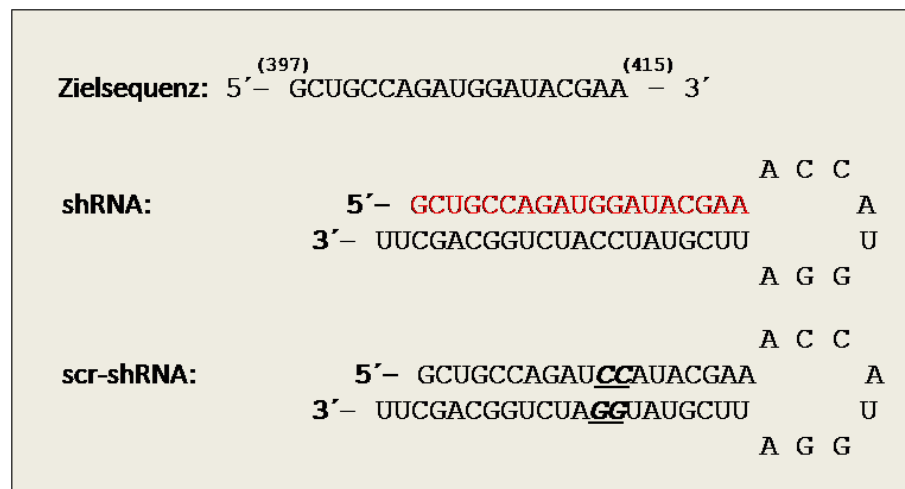
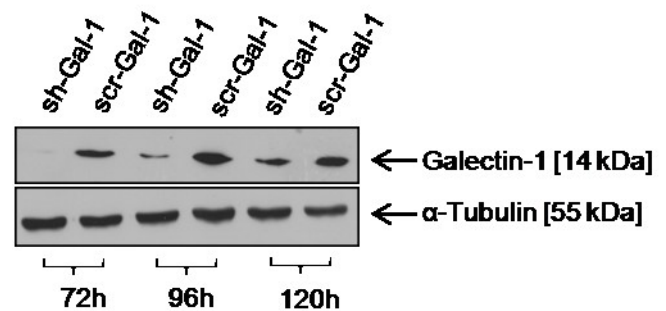


Abb. 5.47: Zielsequenz und Aufbau der sh-RNA für Galectin-1. Der Loop umfasst acht Nukleotide und beinhaltet eine *NcoI*-Schnittstelle. Vor der Sequenzierung konnte die Haarnadelstruktur durch eine Restriktion mit *NcoI* aufgebrochen und die Sequenzierungsreaktion erleichtert werden. Für die *scrambled* (*scr*)-Kontrolle wurden zwei Nukleotide (kursiv geschrieben) ersetzt, um die Spezifität der gegen Galectin-1 gerichteten shRNA zu überprüfen.

Um den induzierbaren *knockdown* der klonierten Galectin-1 shRNA- und scr-shRNA-Konstrukte auf Galectin-1 zu testen, wurden sie transient in drei Versuchsansätzen in COS-7-

Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach 72, 96 bzw. 120 h lysiert. Gleiche Mengen an Protein wurden in einer 15 % -igen SDS-PAGE aufgetrennt. Bei den scr-shRNA-Galectin-1-transfizierten Zellen sollte im Gegensatz zu den mit shRNA-Galectin-1-transfizierten Zellen keine Herunterregulation von Galectin-1 zu beobachten sein, da die Zielsequenz durch den Austausch von zwei Basen nicht vom RISC-Komplex erkannt und gespalten werden sollte. Die Abbildung 5.48 zeigt, dass auch noch 72 h nach der Transfektion von shRNA-Galectin-1 eine deutliche Herabregulation von Galectin-1 zu beobachten war. Der Effekt wurde zwar sukzessive schwächer, war aber auch 96 h und sogar 120 h nach der Transfektion auf Proteinebene noch deutlich zu erfassen. Da die Herabregulation von Galectin-1 durch das generierte shRNA-Konstrukt auf Proteinebene so deutlich zu untersuchen war, wurde auf RNA-Analysen und qPCR verzichtet.

Abb. 5.48: Immunologischer Nachweis von der Herunterregulation von Galectin-1 durch RNAi. COS-7-Zellen wurden mit shRNA-/scr-shRNA-Galectin-1 transfiziert und nach 72, 96 bzw. 120 h lysiert. Die Auftrennung der Lysate erfolgte über eine 15 %-ige SDS-PAGE und der Nachweis über einen anti-Galectin-1-Antikörper. Aufgetragene Ladungsmengen wurden durch Reinkubation der Membran mit anti- α -Tubulin-Antikörper verglichen.



Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte Galectin-1 nun stabil in PC-3-Zellen herabreguliert werden. Die Zellen wurden mit Hilfe von SuperFect Transfektionsreagenz mit shRNA-Galectin-1 und der Kontrolle scr-shRNA-Gal transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Selektionsmedium mit Blasticidin kultiviert. Tote Zellen wurden durch regelmäßiges Wechseln des Kulturmediums entfernt und etwa zwei Wochen nach dem Beginn der Selektion waren erste resistente Kolonien sichtbar. Diese wurden zusammengelegt und so lange weiter kultiviert, bis die erste Passage kryokonserviert werden konnte. Anschließend wurden die Zellen per Immunoblot auf einen *knockout* für Galectin-1 getestet.

Auch nach mehrmaligen Transfektionsversuchen wurde kein stabiler *knockout* für Galectin-1 in den PC-3-Zellen induziert. Weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene war ein stabiler

knockout von Galectin-1 detektierbar. Ähnlich wie bereits in 5.2.7.1.1 beschrieben, haben die Zellen das Plasmid aufgenommen und den Selektionsdruck überlebt. Nicht transfizierte Kontrollzellen wurden auch hier unter Selektionsdruck kultiviert und starben nach etwa zwei Wochen. Die Zellen hatten also keine endogene Resistenz gegenüber dem Selektionsmarker.

5.2.7.3 **Effekt von Tiam1 und Galectin-1 auf die Zellmigration transient transfizierter COS-7-Zellen**

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Tiam1 einen Einfluss auf die Migration humaner Karzinomzellen hat. Dabei unterschieden sich die beobachteten Effekte abhängig von verwendeten Zelltyp und –substrat und abhängig von der Frage, ob unter den jeweiligen Versuchsbedingungen die Ausbildung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Kontakte möglich war oder nicht (Hordijk *et al.*, 1997; Sander *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 1999). Da es während den Versuchen zu der vorliegenden Arbeit nicht gelungen war, Tumorzelllinien stabil mit Galectin-1 zu transfizieren bzw. die Proteinexpression von Galectin-1 in den entsprechenden zu untersuchenden Zellen herunter zu regulieren, wurde der Einfluss von Tiam1 und Galectin-1 auf die Zellmigration in transient transfizierten COS-7-Zellen untersucht. Dazu wurden COS-7-Zellen mit konstitutiv aktivem C1199-Tiam1 und/oder Galectin-1 co-/transfiziert. Als Kontrolle diente ein leerer pMT2SM-Vektor (*mock*). Die Experimente erfolgten im sog. Transwell-Migrationsassay (siehe 4.2.5.1). Die poröse Membran der Transwells wurde zuvor mit Fibronectin beschichtet, dabei blieben die Poren der Membran durchlässig. Die COS-7-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion vereinzelt und in die oberste Kammer des Systems pipettiert. Zwei Stunden später wurden die migrierten Zellen fixiert, mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. C1199-Tiam1 führte zu einer signifikant gesteigerten Migration der COS-7-Zellen. Galectin-1 hatte jedoch keinen Effekt auf die Migration in COS-7-Zellen. Die Co-Expression von C1199-Tiam1 und Galectin-1 zeigte unverändert eine, durch C1199-Tiam1 induzierte, Migrationssteigerung der Zellen.

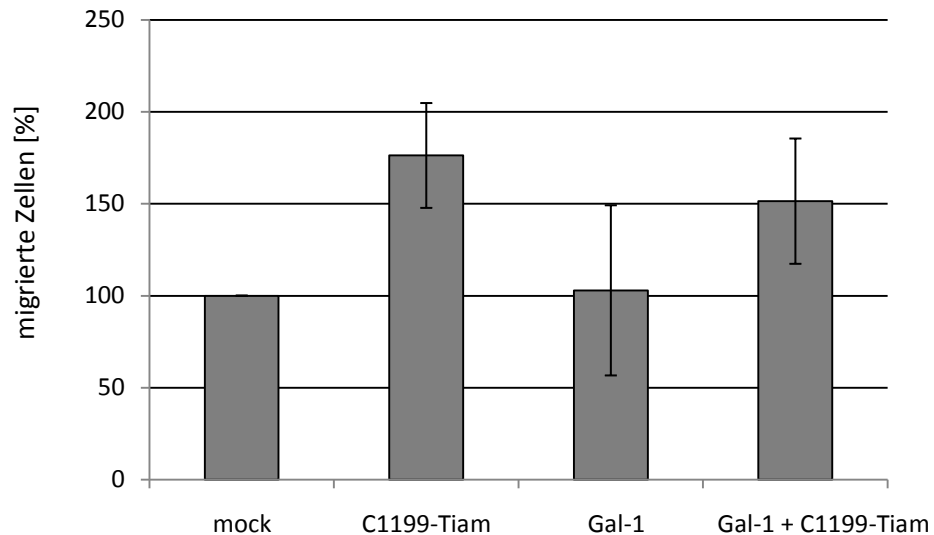
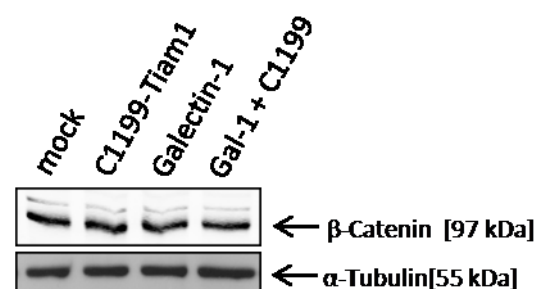


Abb. 5.49: Effekt von Tiam1 und Galectin-1 auf die Zellmigration. COS-7-Zellen wurden transient mit C1199-Tiam1 und / oder Galectin-1 transfiziert und 48 h nach der Transfektion auf Fibronectin-beschichtete Transwells ausgesät. Nach 2 h wurden die migrierten Zellen mit Methanol fixiert, mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Da mögliche Veränderungen der β -Catenin-Expression einen Einfluss auf das Migrationspotential von Zellen haben (Müller *et al.*, 2002), wurde zusätzlich die β -Catenin-Expression nach transients Überexpression von C1199-Tiam1 und Galectin-1 untersucht. Allerdings ergaben sich keinerlei Expressionsunterschiede für β -Catenin in den verschiedenen Versuchsansätzen (Abb. 5.50).

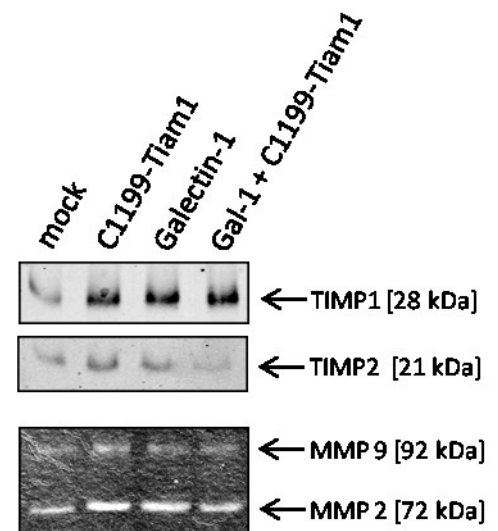
Abb. 5.50: Effekt von Tiam1 und Galectin-1 auf β -Catenin. Cos-7-Zellen wurden mit einem Leervektor, C1199-Tiam1, Galectin-1 und C1199/Galectin-1 transient transfiziert und 48 h später lysiert. Die Auftrennung der Lysate zum Nachweis von β -Catenin erfolgte über eine 8 % -ige SDS-PAGE. Der Nachweis im Immunoblot erfolgte mit anti- β -Catenin-Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper. Anschließend wurde die Membran gestrippt und mit anti- α -Tubulin-Antikörper reinkubiert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche.



5.2.7.4 Sekretion von TIMP1 und TIMP2 sowie MMP2

In früheren Untersuchungen konnte bereits ein Mechanismus identifiziert werden, über den Tiam1 und Rac in humanen Nieren- und Kolonkarzinomzelllinien zu einer selektiven Hochregulation von TIMP-1 und TIMP-2 führen und so die Invasivität dieser Zellen hemmen (Engers *et al.*, 2001). Dabei wurde konstitutiv aktives C1199-Tiam1 für die jeweiligen Untersuchungen eingesetzt. FL-Tiam hatte keinen Effekt auf die Sekretion der TIMPs und MMPs (siehe 6.1.4.2). Daher wurde der Effekt von Galectin-1 auf die Sekretion der TIMPs und MMPs zusammen mit C1199-Tiam1 untersucht. Da auch für Galectin-1 die stabilen Transfektionen in den entsprechenden Versuchen nicht erfolgreich waren, wurden auch diese Versuche in transient transfizierten COS-7-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle diente analog zu den Vinexin- β -Versuchen ein leerer pMT2SM-Vektor (*mock*). Um die Menge der sezernierten Proteine im Western Blot bestimmen zu können, wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion für 24-48 h mit OptiMEM-Medium versetzt. Die Sekretion von TIMP-1 und TIMP-2 wurde nach der Aufkonzentrierung der Überstände im Western Blot, die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 mittels Zymographie (siehe 4.2.6) untersucht (Engers *et al.*, 2001).

Abb. 5.53: Effekt von C1199-Tiam1 und Galectin-1 auf die Sekretion von TIMP-1/-2 und MMP9/2. Cos-7-Zellen wurden mit einem Leervektor, C1199-Tiam1, Galectin-1 und C1199/Galectin-1 transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 h mit OptiMEM versetzt. Die Sekretionslevel von TIMP-1 und -2 wurde durch aufkonzentrierte Überstände im Western Blot untersucht. Die Auftrennung erfolgte über eine 12 % -ige SDS-PAGE. Der Nachweis im Immunoblot erfolgte mit anti-TIMP-1/-2-Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper. Die Sekretionslevel der MMPs 9 und 2 wurden aus denselben Überständen mit Hilfe der Gelatin-Zymographie bestimmt (8 % -iges Gel). Die Abbildung ist repräsentativ für n = 2 Versuche.



Die Untersuchungen der Sekretionslevel von TIMP-1 und -2 zeigten, dass C1199-Tiam1 (im Gegensatz zu FL-Tiam1; vgl. 5.1.7.3) in COS-7-Zellen zu einer gesteigerten Proteinsekretion von TIMP-1 oder -2 führte. Allerdings waren auch die Sekretionslevel von MMP-2 und -9 erhöht, so dass kein Ungleichgewicht zwischen TIMPs und MMPs zu detektieren war. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe in clear-Ca-28-Zellen mit konstitutiv aktivem

C1199-Tiam1 ergaben für TIMP-1 und -2 ebenfalls gesteigerte Protein-Sekretionslevel (Engers et al., 2001). Galectin-1 hatte ebenfalls einen induzierenden Effekt auf die Sekretion von TIMP-1 und -2 und auch von MMP-2 und -9. Die Co-Expression beider Proteine zeigte weiterhin eine gesteigerte Sekretion von TIMP-1 im Vergleich zum leeren Vektor. Die Expression von TIMP-2 wurde hingegen gehemmt. Bezüglich der Sekretionslevel von MMP-9 zeigte sich für C1199-Tiam1 eine leichte Steigerung im Vergleich zum Leervektor, während die Sekretion von MMP-2 durch die Überexpression von C1199-Tiam1 und Galectin-1 leicht gesteigert wurde. Dieses leichte Ungleichgewicht von TIMP-2 und MMP-2 könnte auf eine gesteigerte Invasionsfähigkeit der COS-7-Zellen durch Tiam1 und Galectin-1 hinweisen, obwohl in der Zymographie die eigentlich aktive Gelatinase pro-MMP-2 nicht nachgewiesen werden konnte.

6 Diskussion

Tiam1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von malignen Tumoren aber auch bei der Regulation von zellulärer Adhäsion, Tumordinvasion und Migration (Minard et al., 2004). Über die Mechanismen, die zu einer Aktivierung von Tiam1 und damit auch zu einer Aktivierung des Tiam1/Rac-Signalwegs führen, ist allerdings bislang nur wenig bekannt. Im Vorfeld zu der vorliegenden Arbeit wurde daher mit Hilfe eines Zwei-Hybrid-Systems in Hefen mit einer humanen cDNA-Bank der Niere nach neuen, potentiellen Bindungspartnern von Tiam1 gesucht. Weil der N-Terminus inkl. der PHn-CC-Ex-Domäne von Tiam1 als besonders interessantes Target für potentielle Interaktionsproteine schien, wurden im Y2H die N-terminalen 853 Aminosäuren von Tiam1 als Köder eingesetzt. Auf diese Weise konnten Vinexin- β und Galectin-1 als zwei neue und besonders interessante Bindungspartner von Tiam1 identifiziert werden, die aufgrund ihrer bisher bekannten Funktionen wichtige Rollen in der Regulation des Tiam1/Rac-Signalwegs spielen könnten. Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion von Tiam1 mit Vinexin- β bzw. von Tiam1 mit Galectin-1 mittels Co-Präzipitationsexperimenten zu verifizieren und hinsichtlich möglicher funktioneller Konsequenzen zu untersuchen.

6.1 Die Interaktion von Tiam1 mit Vinexin- β

Vinexin- β wurde erstmalig 1999 als neuer Bindungspartner für das Cytoskelettprotein Vinculin identifiziert (Kioka *et al.*, 1999). Durch seine SH3-Domänen ist Vinexin- β ein sog. Adaptorprotein, das Signalproteine zur Plasmamembran rekrutiert (Buday, 1999). Vinexin- β /Vinculin-Komplexe befinden sich im Bereich der fokalen Kontakte und E-Cadherin-vermittelter Zell-Zelladhäsionen, wo sie u. a. die sog. Zellausbreitung beeinflussen (Kioka *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2005). Dieser Effekt wurde auch bereits für die Tiam1/Rac-Interaktion beschrieben (Hamelers *et al.*, 2005). Die Bindung von Vinexin- β an Sos, einem weiteren GEF für Rac und auch Ras, lässt auch eine Interaktion zwischen Vinexin- β und dem Rac-Aktivator Tiam1 sehr plausibel erscheinen (Akamatsu *et al.*, 1999). Da Tiam1 und Vinexin- β im Bereich des Cytoskeletts ähnliche Funktionen haben, sollte ihre Interaktion in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Dafür sollten die für die Bindung verantwortlichen Tiam1-Domänen identifiziert und die Interaktion hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung für die Tiam1/Rac-Signaltransduktion analysiert werden. Zusätzlich

wurden erste Untersuchungen im Hinblick auf die Regulation verschiedener Tiam1/Rac-abhängiger zellulärer Funktionen durchgeführt.

6.1.1 Charakterisierung der Tiam1-Vinexin- β -Interaktion

Mit Hilfe von konfokaler Laserscanning-Mikroskopie wurde zunächst untersucht, ob sich auch in Zellen eine Co-Lokalisation von Tiam1 und Vinexin- β bestätigen lässt. Die Interaktion im Y2H ließ mehrfach eine positive Galaktosidase-Aktivität erkennen ließ, was auf eine Interaktion beider Proteine hindeutet (Engers *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Hierzu wurde die Rhabdomyosarkomzelllinie BA-HAN-1C transient mit Tiam1 und/oder Vinexin- β co-/transfiziert und anschließend die Lokalisation der Proteine in der Zelle untersucht. Diese Zellen eignen sich aufgrund ihrer relativ hohen Transfektionseffizienz gut für zelluläre Studien. Sie wurden COS-7-Zellen vorgezogen, weil COS-7-Zellen z. T. ein endogenes *ruffling* der Zellmembran zeigen und somit ein vermeintlicher Effekt von Tiam1 und Vinexin- β auf die Zellmorphologie nur schwer zu bewerten gewesen wäre. Für Tiam1 wurde bereits in anderen Zellsystemen gezeigt, dass es einen „pfannkuchenartigen“ Phänotyp und charakteristische Membranaufwerfungen, das sog. *membrane ruffling*, induziert (Michiels *et al.*, 1995). Beide Aspekte konnten für Tiam1 auch in den durchgeführten Versuchen gezeigt werden. Dabei war Tiam1 intrazellulär sowohl im Bereich der *membrane ruffles*, als auch relativ diffus im Cytoplasma der Zelle lokalisiert. Vinexin- β induzierte nach alleiniger Transfektion jedoch keine morphologisch fassbare Veränderung des spindelförmigen Phänotyps der BA-HAN-1C-Zellen. Im Gegensatz zu Tiam1 war Vinexin- β fast ausschließlich diffus im Cytoplasma der Zellen verteilt. Eine Co-Expression von Tiam1 zusammen mit Vinexin- β resultierte in einer Co-Lokalisation beider Proteine im Bereich der *membrane ruffles*. Wie bereits einleitend erwähnt, interagiert Vinexin- β über seine dritte SH3-Domäne auch mit der Kinase Abl, einem Regulator des Aktin-Cytoskeletts (Mitsushima *et al.*, 2006 b). Abl induziert, ähnlich wie Tiam1, *membrane ruffling* in Ratten-Astrocyten und die Abl/Vinexin- β -Komplexe befinden sich im Bereich der *membrane ruffles* (Mitsushima *et al.*, 2006 b). Die Interaktion von Vinexin- β und Abl wird durch die Bindung von Vinexin- β an WAVE2 begünstigt, das Vinexin- β in räumliche Nähe der Plasmamembran und somit auch in räumliche Nähe von Abl bringt. Tiam1 könnte für Vinexin- β demnach eine Art *shuttle*-Protein sein, das Vinexin- β an die Plasmamembran und in räumliche Nähe zu anderen Proteinen bringt, und somit eine ganz ähnliche Funktion erfüllen wie WAVE2. Tiam1-induziertes *membrane ruffling* und auch die „pfannkuchenartige“ Morphologie der Zelle wurden jedoch

durch Vinexin- β weder inhibiert noch gesteigert. Durch die Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte eine Co-Lokalisation beider Proteine in Zellen nachgewiesen werden.

Im Anschluss daran wurde die Interaktion von Tiam1 und Vinexin- β zusätzlich mittels Co-Immunopräzipitation verifiziert. Dazu wurden COS-7-Zellen mit Tiam1 und Vinexin- β bzw. dem entsprechenden Leervektor transient co-transfiziert. Mittels Co-Immunopräzipitation konnte eine spezifische Bindung von Vinexin- β an FL-Tiam1 biochemisch nachgewiesen werden. Der Versuch wurde in umgekehrter Art und Weise wiederholt, d. h. Vinexin- β wurde zusammen mit Tiam1 bzw. einem Leervektor in COS-7-Zellen co-transfiziert. Auch hier zeigte sich nach den entsprechenden Co-Präzipitationsexperimenten eine spezifische Bindung von Tiam1 an Vinexin- β .

Um die für die Tiam1-Vinexin- β -Interaktion verantwortlichen Domänen zu identifizieren, wurden anschließend verschiedene Tiam1-Deletionsmutanten zusammen mit Vinexin- β co-transfiziert und sowohl mittels Co-Immunopräzipitation als auch in Zellen untersucht. Auf biochemischer Ebene hat sich dabei zwar die spezifische Interaktion zwischen FL-Tiam1 und FL-Vinexin- β bestätigt, allerdings ist es nicht gelungen, die für die Interaktion relevante Domäne näher zu charakterisieren. Ein wesentlicher Grund dafür war, dass z. T. erhebliche Expressionsunterschiede der eingesetzten Tiam1-Konstrukte keine sichere Aussage über co-immunopräzipitiertes Vinexin- β erlaubten. So wurde C580-Tiam1 in einer Mehrzahl der durchgeführten Versuche so stark exprimiert, dass Vinexin- β teilweise unspezifisch co-präzipitiert wurde. Eigentlich wurde C580-Tiam1 jedoch als interne Negativ-Kontrolle für die Co-Immunopräzipitations-Experimente eingesetzt, denn mit dieser Mutante war im YTHS wiederholt keine positive Galaktosidase-Aktivität detektierbar (Engers *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Im Gegensatz hierzu wurde N853-Tiam1 in Kombination mit Vinexin- β oft nur sehr schwach exprimiert. Obwohl mit diesem Konstrukt die Interaktion von Tiam1 und Vinexin- β im Y2H erst identifiziert werden konnte, war auf biochemischer Ebene eine sichere Aussage zum Bindungsverhalten beider Proteine nicht sicher möglich. Auch nach verschiedenen Puffermodifikationen ergaben sich keine zufriedenstellenden Ergebnisse bzgl. der näheren Charakterisierung der Vinexin- β -Tiam1-Interaktion, so dass weitere Versuche erforderlich sind, um sowohl die für die Interaktion verantwortliche Tiam1-Domäne zu

identifizieren als auch die Tiam1-Bindung an eine oder mehrere der drei SH3-Domänen von Vinexin- β nachweisen zu können.

Auch die Immunfluoreszenzuntersuchungen konnten nicht sicher Aufschluss über eine Co-Lokalisation und damit einhergehende Interaktion geben. Jedoch scheint neben der katalytischen DH-Domäne besonders der N-Terminus von Tiam1 bzw. die erweiterte N-terminale PH-Domäne (PHn-CC-Ex) wichtig für die Aktivität von Tiam1 zu sein. Die N-terminale Verkürzung von Tiam1 (C1199-Tiam1-Deletionsmutante) führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Proteins (Habets *et al.*, 1994). Der N-Terminus könnte daher eine wichtige Bindungsstelle für Proteine darstellen, die die Aktivität von Tiam1 regulieren. Für den Transkriptionsfaktor c-Myc und das Tumorsuppressorgen Nm23H1 konnte bereits eine Interaktion mit dem N-Terminus von Tiam1 gezeigt werden (Otsuki *et al.*, 2001; 2002). Die PHn-CC-Ex-Domäne spielt hingegen eine wichtige Rolle für die Membranassoziation von Tiam1, die Induktion des charakteristischen *membrane rufflings*, die Aktivierung der c-Jun-Kinase und die Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex (Michiels *et al.*, 1997; Stam *et al.*, 1997; ten Klooster *et al.*, 2006). Zudem führte eine in malignen Tumoren entdeckte und in der PHn-CC-Ex-Domäne lokalisierte Mutation (A441G) zu einer Transformation von NIH-3T3-Zellen (Engers *et al.*, 2000). Auch die Ras-bindende-Domäne von Tiam1 ist in der PHn-CC-Ex-Region lokalisiert und vermittelt die Interaktion mit dem aktiven Ras-Protein und weiterhin die Ras-induzierte Aktivierung von Rac (Lambert *et al.*, 2002). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass eine Interaktion von Tiam1 und Vinexin- β ebenfalls über den N-Terminus bzw. die PHn-CC-Ex-Domäne vermittelt wird, zumal in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass Vinexin- β die Tiam1-Ras-Interaktion kompetitiv hemmt.

6.1.2 Untersuchungen zur Funktion von Vinexin- β in der Signaltransduktion

Mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie und Co-Immunopräzipitation wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation die spezifische Interaktion von Tiam1 und Vinexin- β sowohl in Zellen als auch *in vitro* belegt. Durch diese Interaktion wird Vinexin- β aus dem Cytoplasma der Zelle an die Zellmembran und an die, durch Tiam1 und Rac induzierten, *membrane ruffles* transloziert. Dabei hatte Vinexin- β keinen Effekt auf den Tiam1-vermittelten pfannkuchenartigen Phänotypen der Zelle oder die typischen Membranaufwerfungen. Wie bereits erwähnt, interagiert Vinexin- β über seine dritte SH3-Domäne mit dem GEF Sos, das ähnlich wie Tiam1 den GDP/GTP-Austausch für Rac aber auch

für Ras katalysiert (Akamatsu *et al.*, 1999; Nimnual *et al.*, 1998). Durch Stimulation des EGF-Rezeptors dissoziiert Vinexin- β aus der Bindung mit Sos. Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit in COS-7-Zellen reproduziert werden. Desweiteren führten die Überexpression von Vinexin- β zusammen mit EGF-Stimulation in NIH3T3- oder COS-7-Zellen zu einer gesteigerten Aktivierung der JNK/SAPK (Akamatsu *et al.*, 1999). Zusätzlich konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch Tiam1 zu einer partiellen Dissoziation von Vinexin- β und Sos führt, und dass dieser Einfluss von Tiam1 unabhängig von der EGF-Rezeptor-Stimulation ist. Daher wurde der Effekt von EGF auf die Tiam1-Vinexin- β -Bindung untersucht. Interessanterweise konnte die Intensität der Interaktion zwischen Tiam1 und Vinexin- β durch die Stimulation des EGF-Rezeptors deutlich gesteigert werden. Die Ergebnisse aus den Co-Immunopräzipitationsversuchen wurden mit computergestützter Densitometrie ausgewertet und ergaben, dass sich die Bindungsintensität von Tiam1 und Vinexin- β nach EGF-Stimulation im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle fast verdoppelt.

Tiam1 bindet über seine Ras-bindende-Domäne (RBD) bevorzugt an Ras-GTP, also aktives Ras (Lambert *et al.*, 2002; Ponting, 1999). Die Stimulation mit EGF führt zu einer Aktivierung von Ras (Elad-Sfadia *et al.*, 2002), und sollte somit, im Vergleich zu unstimulierten Zellen, ebenfalls zu einer gesteigerten Bindung von Ras an Tiam1 führen. Da die EGF-Stimulation jedoch auch zu einer gesteigerten Bindung von Tiam1 an Vinexin- β führt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch untersucht, ob Vinexin- β die Interaktion von Tiam1 und Ras möglicherweise beeinflussen könnte. Hier waren zwei verschiedene Modelle denkbar: zum einen könnte Vinexin- β die Bindung zwischen Tiam1 und Ras kompetitiv hemmen, zum anderen wäre es möglich, dass Vinexin- β durch Bindung an Tiam1 eine Konformationsänderung des Tiam1-Proteins induziert und somit evtl. die Bindung von Ras an Tiam1 fördern könnte. Die Überexpression von Vinexin- β in COS-7-Zellen hemmt die Bindung von Tiam1 und Ras in COS-7-Zellen unabhängig von einer EGF-Stimulation, wohingegen die Überexpression von Vinexin- β in HEK293-Zellen keinen deutlichen Effekt auf die Tiam1-Ras-Interaktion hat. Die Bindung zwischen Tiam1 und Ras wird also EGF-unabhängig durch Vinexin- β blockiert, wohingegen nach EGF-Stimulation die Tiam1-Vinexin- β -Interaktion gesteigert werden konnte. Gleichzeitig führen sowohl die Stimulation des EGF-Rezeptors als auch eine Überexpression von Tiam1 zu einer partiellen Dissoziation von Vinexin- β und Sos. In Abbildung 6.1 ist die mögliche Signalweiterleitung in COS-7-Zellen darstellt.

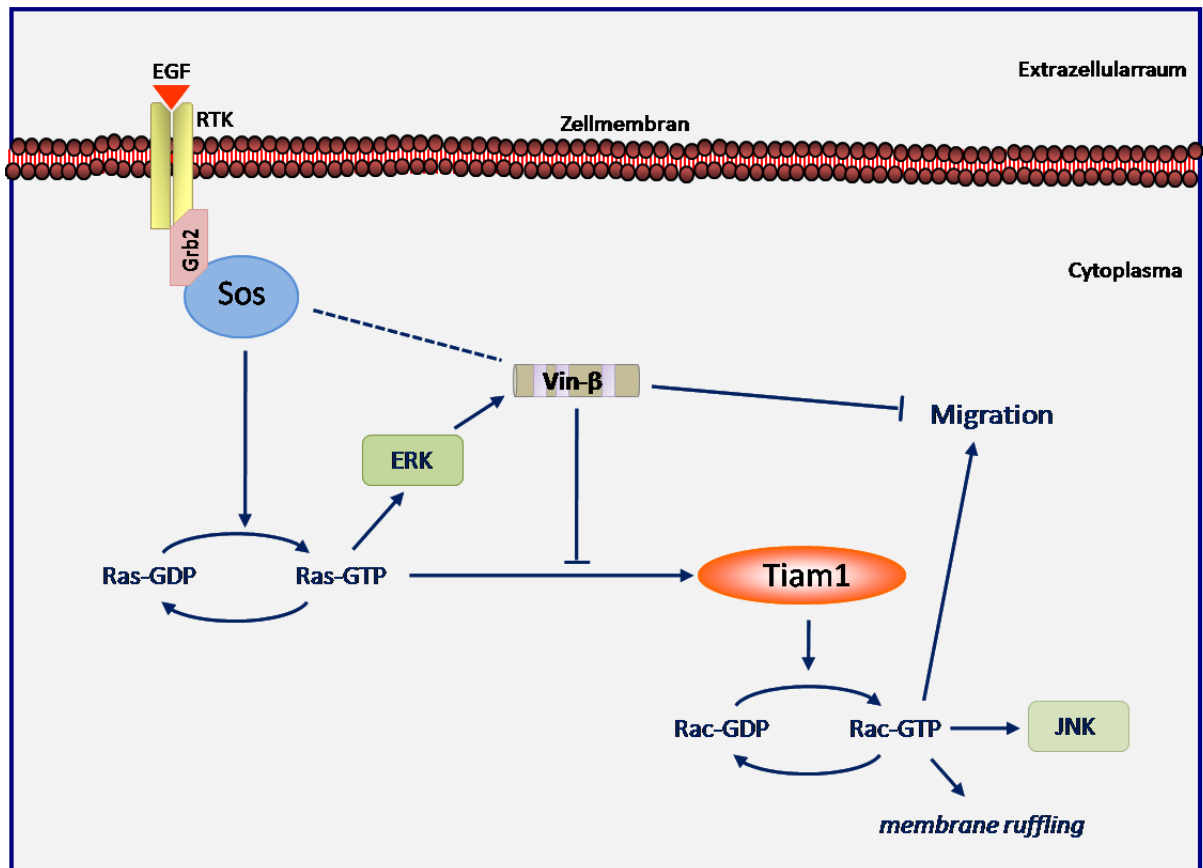


Abb. 6.1: Mögliche Funktion von Vinexin-β innerhalb der Tiam1/Rac-Signalweiterleitung in COS-7-Zellen. Eine EGF-Stimulation führt zur Dissoziation des Sos-Vinexin-β-Komplexes und einer Bindung von Sos an die Rezeptortyrosinkinase (RTK), wo Sos den GDP/GTP-Austausch für Ras katalysiert. Aktives Ras wird für die vollständige Rac-Aktivierung durch Tiam1 benötigt, die nachfolgend in *membrane ruffling*, der Aktivierung von JNK und gesteigerter Migration resultiert. Außerdem aktiviert Ras-GTP über die Raf-1-Signalkaskade ERK, welches weiterhin Vinexin-β phosphoryliert. Vinexin-β hemmt die Tiam1-Ras-Interaktion und zudem die Migration von COS-7-Zellen.

Tiam1 bindet über seine RBD an aktives Ras und diese Interaktion wird für die vollständige Ras-induzierte Rac-Aktivierung benötigt (Lambert *et al.*, 2002). Während den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation konnte in COS-7-Zellen gezeigt werden, dass Vinexin-β die Interaktion von Ras und Tiam1 unabhängig von einer EGF-Stimulation unterdrückt. Außerdem hemmt die Überexpression von Vinexin-β die Migration von LNCaP-Zellen (Mizutani *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Migration von COS-7-Zellen durch Vinexin-β leicht gehemmt wurde. Ähnliche Effekte wurden für das 16-kDa Prolactin (16k PRL) beschrieben (Lee *et al.*, 2007). Dieses N-terminale Fragment des intakten 23-kDa Prolactins besitzt mögliche anti-angiogenetische bzw. anti-Tumor Aufgaben und inhibiert abhängig von der PI3-Kinase die Aktivierung von Rac und die

nachgeschaltete Rac-Signalweiterleitung durch die Suppression der Tiam1 /Ras-Interaktion (Lee *et al.*, 2007). Allerdings konnte weder ein Effekt von Vinexin- β auf die Aktivierung von Ras gezeigt werden noch auf die Tiam1-induzierte Rac-Aktivierung. Neben den bislang beschriebenen Funktionen von Vinexin- β besitzt es zudem auch regulierende Funktionen innerhalb der Transkriptionskontrolle. Im Zellkern bindet Vinexin- β an die AF-Domäne des Transkriptionsfaktors RAR γ , der die Expression der Retinsäure-regulierten Gene steuert, und verhindert so dessen transkriptionelle Aktivität (Bour *et al.*, 2005). Durch eine Phosphorylierung der AF-Domäne dissoziiert Vinexin- β aus dieser Bindung (Bour *et al.*, 2005). Da Vinexin- β durch seine Interaktion mit RAR γ in den Zellkern transloziert, könnte es bereits an dieser Stelle die Transkription von Tiam1 unterdrücken und durch die Interaktion mit bereits translatiertem Tiam1 die Interaktion mit Ras-GTP unterbinden, so dass nachfolgend die Ras-induzierte Rac-Aktivierung gehemmt wird.

Allerdings sind weitere Untersuchungen, z. B. zum Einfluss von Vinexin- β auf die Expression von Tiam1, Ras und Rac auf mRNA-Ebene, erforderlich, um die Relevanz der Tiam1/Vinexin- β -Interaktion weiter bestimmen zu können. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass Vinexin- β , ähnlich wie 16k PRL, *upstream* des Tiam1/Rac-Signalwegs die Aktivität von Tiam1 beeinflusst, indem es die Expression von Tiam1 auf bereits transkriptioneller unterdrückt bzw. durch die Interaktion mit Tiam1 das Ras-vermittelte Tiam1-Signaling beeinflusst. In weiteren Untersuchungen könnte zum einen ein Reporterassay Aufschluß darüber geben, ob bzw. inwiefern Vinexin- β die Aktivität des Tiam1-Promotors beeinflusst und somit die Tiam1-Expression reguliert. Zum anderen könnte mittels quantitativer Echtzeit-PCR der Einfluss von Vinexin- β auf die mRNA-Mengen von endogenem Tiam1 in Zellen untersucht werden

6.1.3 Funktionelle Bedeutung der Tiam-1-Vinexin- β -Interaktion für die Rac-vermittelte Signalweitergabe

Nachdem die spezifische Interaktion von Vinexin- β und Tiam1 in Zellen und durch Co-Immunopräzipitationsexperimente auch *in vitro* belegt werden konnte, sollte in den weiterführenden Experimenten ein möglicher Einfluss der Interaktion zwischen Vinexin- β und Tiam1 auf die Tiam/Rac-induzierten nachgeschalteten Signalwege untersucht werden. Wie bereits einleitend erwähnt, induzieren Tiam1 und Rac in Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp und Zellsubstrat mindestens sechs voneinander unabhängige Signalwege (Westwick *et al.*, 1997).

Zuvor wurde jedoch die Bedeutung von Vinexin- β für die Tiam1-induzierte Rac-Aktivierung in COS-7- und in HEK293-Zellen untersucht. Tiam1 katalysiert spezifisch den GDP/GTP-Austausch der Rho-ähnlichen GTPase Rac und zusammen regulieren Tiam1 und Rac wichtige zelluläre Prozesse bezüglich maligner Transformation, Tumorprogression und Metastasierung (Buchanan *et al.*, 2000; Fleming *et al.*, 2000). Dazu gehört z. B. das sog. *membrane ruffling*, eine Modifikation der Plasmamembran. Im Gegensatz zur invasionssteigernden Funktion in murinen T-Lymphomzellen führte eine Überexpression von Tiam1 und Rac in Ras-transformierten MDCK-Zellen jedoch zu einer Hemmung der Invasion, die auf E-Cadherin vermittelter Zell-Zelladhäsion beruht (Hordijk *et al.*, 1997; Kuroda *et al.*, 1997; Takaishi *et al.*, 1997). Zudem hat Tiam1 auch eine entscheidende Bedeutung für die Entstehung von Tumoren. In entsprechenden Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass Tiam1 sowohl bei der Entstehung Ras-induzierter Hauttumore benötigt wird, aber auch ein Zielgen des Wnt-Signalwegs ist und somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung hereditärer Darmtumore spielt (Malliri *et al.*, 2006). Fleming *et al.* konnten zeigen, dass die Aktivierung von Tiam1 durch Phosphorylierung reguliert werden kann (1999). Auch die Bindung von bestimmten Liganden an die N-terminale PH-Domäne von Tiam1 erhöht möglicherweise die GDP/GTP-Austauschaktivität und damit die Selektivität der Rac-vermittelten Signalweitergabe (Crompton *et al.*, 1999; Mertens *et al.*, 2003).

Da die Aktivierung der Rac-nachgeschalteten Signalwege abhängig vom verwendeten Zelltyp ist, wurden die Untersuchungen im Bezug auf die Rac-Aktivierung und die Vermittlung der nachgeschalteten Signalwege in den o. g. Zellsystemen untersucht. Wie erwartet führte konstitutiv aktives C1199-Tiam1 sowohl in COS-7-Zellen als auch in HEK293-Zellen zu einer deutlichen Aktivierung von Rac. Auch das Volllängen-Konstrukt (FL) von Tiam1 zeigte eine Rac-Aktivierung, die in COS-7-Zellen jedoch nur sehr schwach ausfiel. Vinexin- β hatte selbst keinen Einfluss auf die Aktivierung von Rac. Da Vinexin- β in Gegenwart von EGF jedoch in der Lage ist sowohl ERK als auch JNK, und damit Signalwege unterhalb von Rac, zu aktivieren (Akamatsu *et al.*, 1999), wurden die Aktivitätsassays für Rac auch unter Stimulation des EGF-Rezeptors durchgeführt. Allerdings konnte auch hier keine Aktivierung von Rac durch Vinexin- β festgestellt werden. Co-Transfektion von Tiam1 und Vinexin- β resultierten hingegen in einer geringeren Rac-Aktivierung im Vergleich zu Tiam1 alleine. Hier konnte jedoch nicht geklärt werden, ob dieser Effekt damit zusammenhing, dass die Co-Expression von Tiam1 und Vinexin- β regelmäßig in einer geringeren Expression von Tiam1 resultierte

und Tiam1 dadurch einen geringeren Effekt auf die Rac-Aktivierung hatte, oder ob Vinexin- β den von Tiam1 induzierten Effekt inhibierte. Denkbar wäre hier jedoch ein ähnlicher Einfluss von Vinexin- β , wie er bereits für Nm23H1 beschrieben wurde. Nm23H1 bindet an den N-terminalen Bereich von Tiam1 und inhibiert seine Funktion als GEF. Otsuki *et al.* vermuteten, dass die Bindung von Nm23H1 an Tiam1 mit einer Konformationsänderung des Tiam1-Proteins einhergeht oder dass die intrazelluläre Lokalisation von Tiam1 verändert wird, das im Rahmen seiner Aktivierung an die Plasmamembran transloziert (2000). Ein ähnlicher Effekt auf die Tiam1-Aktivität wäre auch für Vinexin- β denkbar. Vinexin- β ist jedoch nicht nur im Cytoplasma der Zelle, sondern auch im Nukleus lokalisiert und neben den bisher beschriebenen Funktionen bzgl. der Regulation und Organisation des Cytoskeletts sowie der Signaltransduktion hat Vinexin- β auch einen Einfluss auf die Regulation der Transkription. Durch die Interaktion mit der AF-1-Domäne des Transkriptionsfaktors RAR γ verhindert Vinexin- β dessen transkriptionelle Aktivität. (Bour *et al.*, 2005). Eine Phosphorylierung der AF-1-Domäne resultiert in einer Dissoziation von Vinexin- β aus dem Komplex (Bour *et al.*, 2005). Möglicherweise verhindert Vinexin- β durch seine Lokalisation im Zellkern direkt die Transkription von Tiam1 und hat somit Einfluss auf die Intensität der nachgeschalteten Tiam1-vermittelten Rac-Aktivierung.

Unabhängig von den im Rac-Aktivitätsassay erzielten Ergebnissen wurde der Einfluss der Vinexin- β -Tiam1-Interaktion auf die Aktivität der Signalwege unterhalb von Rac untersucht. Diese Versuche wurden, wenn möglich, ebenfalls in HEK293- und COS-7-Zellen durchgeführt. Da sich kein Unterschied für die Rac-Aktivierung nach einer Stimulation des EGF-Rezeptors ergab, wurden auch alle nachfolgenden Versuche ohne EGF-Stimulation durchgeführt.

Die hier durchgeführten Untersuchungen auf den Effekt von Vinexin- β unterhalb von Rac wurden ohne Stimulation des EGF-Rezeptors durchgeführt. Sie sollten jedoch unter EGF-Stimulation wiederholt werden, um Vinexin- β als Bindeglied zwischen dem EGF- und dem Tiam1/Rac-Signalweg zu bekräftigen. Das Ziel weitergehender Untersuchungen sollte es sein, die funktionelle Rolle der Tiam1-Vin- β -Interaktion weiter zu charakterisieren.

6.1.3.1 **ERK1,2**

In den durchgeführten Versuchen bzgl. der ERK-Aktivierung durch Tiam1 und/oder Vinexin- β zeigte sich weder ein Einfluss von Tiam1 noch von Vinexin- β auf die Aktivierung von ERK1, 2. Dieses Ergebnis ließ sich über zwei Zellsysteme hinweg, nämlich in COS-7- und in HEK293-

Zellen, beobachten. Für Vinexin- β war das erzielte Ergebnis durchaus zu erwarten. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass sich eine nachweisbare direkte Aktivierung von ERK1, 2 sich ausschließlich auf nicht adhärente Zellen beschränkt (Suwa *et al.*, 2002). Eine Aktivierung von ERK2 in diesen Zellen erfolgt dabei abhängig von PKA und PAK. Dabei wurde die Vinexin- β induzierte Aktivierung von PAK von PKA gehemmt. In adhären Zellen hatte Vinexin- β im Gegensatz dazu keinen Einfluss auf die PKA/PAK-induzierte Aktivierung von ERK2 (Suwa *et al.*, 2002). Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die COS-7- und HEK293-Zellen jedoch ausschließlich adhärent kultiviert. Ein Ausbleiben eines aktivierenden Effekts von Vinexin- β auf ERK1, 2 deckte sich daher mit den bisher bekannten Ergebnissen. Die durchgeführten Versuche zeigten jedoch auch keinen Einfluss von Tiam1 auf die Aktivierung von ERK1, 2, weder in COS-7- noch in HEK293-Zellen. In früheren Untersuchungen konnte in humanen Nierenkarzinomzellen im Zuge der Aktivierung von TIMP-1 und -2 eine Aktivierung von ERK1, 2 durch Tiam1/Rac gezeigt werden (Engers *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu wurde in NIH3T3-Zellen und COS-7-Zellen kein Effekt von Tiam1/Rac auf die Aktivierung von ERK1, 2 nachgewiesen (Zohn *et al.*, 1998; Leng *et al.*, 1999). Minard *et al.* beschrieben für die Tiam1/Rac-abhängige Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen eine Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp (1994), daher ist es durchaus möglich dass Tiam1 weder in COS-7- noch in HEK293-Zellen einen aktivierenden Effekt auf ERK ausübt.

6.1.3.2 **p70S6-Kinase**

In den durchgeführten Versuchen in Bezug auf die Aktivierung der p70S6-Kinase zeigte sich weder für Vinexin- β noch für Tiam1 ein Einfluss auf die Phosphorylierung von p70S6. Obwohl Tiam1 mit Hilfe seiner PHn-CC-Ex-Domäne mit dem Gerüst-Protein Spinophilin interagiert und für diese Interaktion eine nachfolgende Aktivierung der p70S6-Kinase beschrieben werden konnte (Buchsbaum *et al.*, 2003), konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein Effekt von Tiam1 detektiert werden. Für Vinexin- β ergibt sich aus den durchgeführten Versuchen ebenfalls kein Hinweis auf einen aktivierenden bzw. inhibierenden Effekt auf die p70S6-Kinase. In der bislang veröffentlichten Fachliteratur konnte ebenfalls kein Hinweis darauf gefunden werden, dass Vinexin- β an der Regulation der p70S6-Kinase beteiligt ist. Es kann daher angenommen werden, dass Vinexin- β keinen Einfluss auf die Rac-vermittelte Aktivierung von p70S6 hat.

6.1.3.3 **CyclinD1**

Die Versuche zeigten, dass weder Tiam1 noch Vinexin- β die Expression von CyclinD1 in COS-7-Zellen beeinflussen. Der in HEK293-Zellen durchgeführte Versuch zeigt tendenziell eine verstärkte Expression von CyclinD1 nach transienter Überexpression von Tiam1 und/oder Vinexin- β . Der Einfluss der Tiam1-Überexpression auf die Expression von CyclinD1 hängt vermutlich davon ab, in welchem Zellsystem die Versuche durchgeführt werden. Während Tiam1 in COS-7-Zellen keinen Effekt auf die Expression von CyclinD1 zeigte, konnte in HEK293-Zellen eine gesteigerte CyclinD1-Expression detektiert werden. Koziczak *et al.* beschrieben in humanen Brustkarzinomzellen eine erhöhte Expression für CyclinD1, die sich nachfolgend aus der Aktivierung der p70S6-Kinase ergab (2004). Da sich im Rahmen dieser Arbeit weder für Tiam1 noch für Vinexin- β ein Einfluss auf die Phosphorylierung der p70S6-Kinase zeigte, wäre es durchaus denkbar, dass weder Tiam1 noch Vinexin- β die Expression von CyclinD1 beeinflussen. Andererseits führt die Stimulation des Wnt-Signalwegs in Kolonkarzinomzellen zu Tiam1-induzierter Rac-Aktivierung und nachfolgend zu einer erhöhten Transkription der Wnt-Zielgene c-Myc und CyclinD1 (Buongiorno *et al.*, 2008). Obwohl der Wnt-Signalweg in HEK293-Zellen eigentlich inaktiv ist, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Tiam1 und evtl. Vinexin- β in der Lage, sind mit CyclinD1 ein Wnt-Zielgen zu beeinflussen. Die genaue Bedeutung von Tiam1 und Vinexin- β für die Regulation der Expression von CyclinD1 bleibt jedoch ungeklärt. Hierfür sind weitere Untersuchungen erforderlich.

6.1.3.4 **JNK**

In COS-7-Zellen konnte für Tiam1 bereits gezeigt werden, dass seine Membranlokalisation zu einer Aktivierung von JNK durch Rac führte (Michiels *et al.*, 1997). Tiam1 führte zu einer deutlichen Aktivierung von JNK, während die Überexpression von Vinexin- β keinen Einfluss auf die Aktivierung von JNK hatte. Akamatsu *et al.* haben bereits 1999 gezeigt, dass eine Überexpression von Vinexin- β nach Stimulation des EGF-Rezeptors in COS-7-Zellen zu einer gesteigerten JNK-Aktivität führte. Allerdings war für diese Aktivierung die Interaktion mit dem GEF Sos von Bedeutung (Akamatsu *et al.*, 1999). Obwohl der Komplex aus Vinexin- β und Sos nach EGF-Stimulation dissoziiert, ist die Interaktion dennoch von entscheidender Bedeutung für die nachfolgende JNK-Aktivierung. Vermutlich bringt Vinexin- β Sos in räumliche Nähe zu anderen Signalmolekülen der fokalen Adhäsionen, so dass Sos anschließend Rac aktiviert, was zu einer weiteren Aktivierung von JNK führen könnte.

(Minden *et al.*, 1995; Nimnual *et al.*, 1998; Akamatsu *et al.*, 1999). Nach Co-Expression von Tiam1 und Vinexin- β konnte sogar noch eine gesteigerte Aktivierung von JNK erhalten werden als nach alleiniger Überexpression von Tiam1. Dieser, auf den ersten Blick widersprüchliche, Effekt lässt sich evtl. damit erklären, dass Tiam1 unabhängig von EGF-Stimulation zu einer partiellen Dissoziation von Vinexin- β und Sos führt. Möglicherweise reicht schon der Zerfall des Vinexin- β -Sos-Komplex aus, damit Rac durch Sos aktiviert werden kann und in der nachfolgenden Signalkaskade eine Aktivierung von JNK erreicht wird. Für Vinexin- β wäre hier eine Rolle als „molekularer Schalter“ denkbar, der durch seine Interaktion mit den verschiedenen GEFs, Tiam1 und/oder Sos, für Rac die selektive Aktivierung der Rac-vermittelten Signalweitergabe entscheidend beeinflussen könnte. Die genaue Rolle für die Tiam1-Vinexin- β -Interaktion innerhalb der Signalweitergabe muss allerdings in weiterführenden Untersuchungen näher determiniert werden.

6.1.3.5 **NF- κ B**

Der nukleäre Faktor κ B (NF- κ B) ist ein proinflammatorischer Transkriptionsfaktor, der eine wesentliche Rolle in der Entstehung und Progression maligner Tumore spielt. NF- κ B ist in Krebszellen konstitutiv aktiv und eine Inhibition von NF- κ B resultiert in einer Verminderung des onkogenen Potentials dieser Zellen (Sethi *et al.*, 2008). Für die Rho-ähnlichen GTPasen und im speziellen für Rac konnte bereits gezeigt werden, dass sie NF- κ B aktivieren. Auch für Dbl, ein GEF zu dessen Familie auch Tiam1 gehört, wurde eine Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen (Sulciner *et al.*, 1996; Perona *et al.*, 1997; Montaner *et al.*, 1998). Daher sollte auch der Effekt von Tiam1 und Vinexin- β auf die Expression von NF- κ B untersucht werden. Es konnte jedoch kein Einfluss auf die Expression von NF- κ B nach transienter Überexpression von Tiam1 oder Vinexin- β in COS-7- und HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Sulciner *et al.*, verwendeten HeLa-Zellen für den Nachweis der NF- κ B-Aktivierung durch konstitutiv aktives Rac G12V (1996). In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Tiam1 und Vinexin- β auf die Aktivierung von NF- κ B untersucht. Vermutlich ist jedoch die durch FL-Tiam zu erreichende Aktivierung von Rac-GDP zu Rac-GTP in den untersuchten Zellen zu gering, um eine nachgeschaltete Aktivierung von NF- κ B zu erreichen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die durch Tiam1-vermittelte Effekte auf die Rac-vermittelte Signalweitergabe je nach verwendetem Zelltyp variieren.

6.1.3.6 **ROS**

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie z. B. H_2O_2 , induzieren die Phosphorylierung von ERK und aktivieren somit den ERK-Signalweg (Guyton *et al.*, 1996). Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch Rac eine wichtige Rolle für die Aktivierung von ROS-produzierenden Enzymen, wie z. B. die NADPH-Oxydase Nox hat (Miyano *et al.*, 2009; Miyano *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2006). In humanen RCC-Zellen konnte für Rac eine gesteigerte Bildung von ROS nachgewiesen werden, die in einer Aktivierung von ERK resultierte (Engers *et al.*, 2006). Rygiel *et al.* beschrieben auch für Tiam1 eine Aktivierung des ERK-Signalwegs durch kontrollierte ROS-Produktion in murinen Keranitocyten (2008). Für Vinexin- β wurde in der bislang veröffentlichten Literatur kein Effekt auf die Produktion von ROS veröffentlicht. Da Tiam1 ein spezifischer Aktivator von Rac ist, wurde in dieser Arbeit auch der Effekt von Tiam1 und Vinexin- β auf die ROS-Produktion in COS-7-Zellen untersucht. Allerdings zeigte sich in den durchgeführten Analysen kein Einfluss von Tiam1 und Vinexin- β auf die Bildung von ROS. Auch die C1199-Tiam-Deletionsmutante führte nur zu einem schwachen messbaren Anstieg in der ROS-Produktion. Sulciner *et al.* postulierten für Rac eine redox-abhängige Aktivierung von NF- κ B in HeLa-Zellen (1996). Innerhalb dieser Arbeit konnte in den untersuchten COS-7-Zellen jedoch weder eine gesteigerte Aktivierung von ERK noch ein Effekt von Tiam1 oder Vinexin- β auf die Aktivierung von NF- κ B gezeigt werden. Das erhärtet die Vermutung, dass die bislang untersuchten Effekte für Tiam1 und Rac sich nicht beliebig auf jedes Zellsystem übertragen lassen.

6.1.3.7 **Cytosolische Phospholipase (cPLA₂)**

Die cytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) ist ein weiterer Effektor unterhalb von Rac. Sie spielt u. a. eine wichtige Rolle bei der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts, der Zelltransformation, der Stimulation von JNK und der Aktivierung des *c-fos Serum Response Elements* (SRE) (Peppelenbosch *et al.*, 1995; Hong-Geller *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1997; Yoo *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Tiam1 und Vinexin- β auf cPLA₂ daher indirekt über eine Aktivierung des SRE-Promotors bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass der Promotor des SRE durch konstitutiv aktives Rac G12V im Luciferase-Reporter-Gen-Assay erfolgreich aktiviert werden kann. Dieses Ergebnis war zu erwarten, denn bereits 2000 konnten Woo *et al.* in Rac G12V -stabil transfizierten Ratten-Fibroblasten eine Aktivierung von cPLA₂ zeigen (Woo *et al.*, 2000). Rac G12V wurde daher als interne Positivkontrolle für die durchgeführten Versuche verwendet. Auch die Überexpression von Tiam1 führte zu einer

deutlichen Aktivierung des SRE-Promotors. Für Tiam1 konnte somit gezeigt werden, dass es durch seine GEF-Aktivität für Rac einen indirekten Einfluss auf die Aktivierung des SRE-Promotors hat und damit auch die Aktivität der cPLA₂ beeinflussen könnte. Die Transfektion von Vinexin-β führte nicht zu Aktivierung des SRE-Promotors im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Weiterhin führte eine Co-Expression von Tiam1 und Vinexin-β zwar noch zu einer Aktivierung des SRE-Promotors, allerdings schien Vinexin-β hier den durch Tiam1 induzierten Effekt zu inhibieren. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte aber berücksichtigt werden, dass Tiam1 in den mit Vinexin-β co-transfizierten Ansätzen konstant deutlich geringer exprimiert wurde, als nach alleiniger Transfektion. Dieser Effekt wurde reproduzierbar in den durchgeführten Experimenten beobachtet, obwohl in den Transfektionsansätzen eine etwa fünffach höhere Menge der Tiam1-DNA im Vergleich zur transfizierten Vinexin-β-DNA eingesetzt wurde. Daher konnte auch nicht sicher geklärt werden, ob der durch Tiam1 vermittelte Effekt auf die Aktivität des SRE-Promotors durch Vinexin-β gehemmt wird, oder ob die geringere Luciferase-Aktivität im Vergleich zu Tiam1 alleine durch die geringere Expression von Tiam1 zu erklären ist. In der bislang veröffentlichten Literatur wurden weder Effekte für Tiam1 noch für Vinexin-β auf die Aktivierung der cPLA₂ beschrieben. Für die Aktivierung von cPLA₂ durch Rac wurde von Woo *et al.* ein Mechanismus beschrieben, der die p38 MAP Kinase beinhaltet (Woo *et al.*, 2000). Auch in HEK293-Zellen konnte bereits eine Aktivierung von cPLA₂ durch p38 gezeigt werden (Hefner *et al.*, 2000). Auch wenn in der vorliegenden Arbeit ein deutlicher Effekt für Tiam1 auf die Aktivierung des SRE-Promotors gezeigt werden konnte, der vermutlich aus einer Aktivierung der cPLA₂ resultiert, müssen weitere Untersuchungen klären, ob auch in COS-7-Zellen die Signalkaskade selektiv über p38 führt.

6.1.3.8 **Akt-Kinase**

Rac aktiviert in NIH3T3-Zellen auch die Serin/Threonin Kinase Akt (Singh *et al.*, 2004), und auch für die DH-PH-Domänenkombination von Tiam1 konnte in NIH3T3-Zellen bereits eine leichte Aktivierung von Akt gezeigt werden (Wennerberg *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Tiam1 und Vinexin-β auf eine Aktivierung von Akt in COS-7- und HEK293-Zellen untersucht. Die Analysen ergaben für konstitutiv aktives C1199-Tiam1 und FL-Tiam1 eine deutliche Aktivierung von Akt in den untersuchten Zellsystemen. Für Vinexin-β wurde bislang kein Effekt auf die Aktivierung von Akt beschrieben und in den durchgeführten Untersuchungen ergaben nach Transfektion von Vinexin-β unterschiedliche

Ergebnisse im Hinblick auf den verwendeten Zelltyp. Im Gegensatz zu Tiam1 führte Vinexin- β in COS-7-Zellen nicht zu einer Phosphorylierung von Akt. Nach Co-Transfektion von Tiam1 und Vinexin- β wurde die durch Tiam1 induzierte Akt-Phosphorylierung jedoch deutlich gehemmt. Auch hier sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass durch das geringere Expressionslevel von FL-Tiam1 in den co-transfizierten Ansätzen auch über mehrere Versuche hinweg nicht sicher geklärt werden konnte, ob Vinexin- β tatsächlich den FL-Tiam1-Effekt antagonisiert, oder ob die geringere Akt-Phosphorylierung durch ein niedrigeres Tiam1-Expressionsniveau zu erklären war. Im Gegensatz dazu führte die Expression von Vinexin- β in HEK293-Zellen zu einem deutlichen Anstieg von phosphoryliertem Akt, und auch die Co-Expression von Tiam1 und Vinexin- β resultierte in einer gesteigerten Akt-Phosphorylierung im Vergleich zu Tiam1. Die Ergebnisse zeigen, dass die Effekte von Vinexin- β hinsichtlich der Phosphorylierung von Akt auf den ersten Blick zwar widersprüchlich aber offenbar abhängig vom verwendeten Zelltyp sind. Für Tiam1 konnte in Bezug auf die Aktivierung von Akt unlängst eine wichtige Rolle in der PI3-Kinase-induzierten T-Lymphomagenese gezeigt werden (Strumane *et al.*, 2008). Die PI3-Kinase stimuliert die Entwicklung von Tumoren durch Akt-vermittelte Zellproliferation und eine Verminderung der Apoptoserate (Strumane *et al.*, 2008; Martelli *et al.*, 2007). Durch eine 2007 identifizierte Punktmutation (E17K) in Akt, umgeht die Kinase allerdings die Aktivierung durch PI3K. Durch diese Mutation ändert sich die Konformation der PH-Domäne von Akt, so dass Akt konstitutiv an die Membran binden kann und dort aktiviert wird, ohne dass eine Regulation durch PI3K nötig ist (Carpten *et al.*, 2007). Man hat zudem festgestellt, dass Mäuse mit einem Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens P-TEN T-Zell-Lymphome entwickelt haben, die eine gesteigerte, durch PI3-K induzierte, Akt-Phosphorylierung aufwiesen. Wurde in diesen Mäusen zusätzlich Tiam1 nicht exprimiert, so drangen die T-Lymphomzellen deutlich häufiger in andere Organe ein als in den verglichenen Wildtyp-Tieren. Überraschenderweise zeigten Tiam1-*knockout* T-Lymphomzellen ein erhöhtes Rac-GTP-Level, so dass angenommen wird, dass ein Verlust von Tiam1 durch andere Rac-aktivierende Mechanismen kompensiert wird, um im Anschluß daran eine gesteigerte PI3K-Aktivität und somit Akt-Phosphorylierung zu erhalten (Strumane *et al.*, 2008). Diese Daten und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Tiam1 induzierte Rac-Aktivierung selektiv in Richtung von Akt gelenkt wird. Auch Gonzalez *et al.* vermuten, dass eine durch Tiam1

induzierte Aktivierung von Rac zu einer nachfolgenden Aktivierung von PI3K und Akt führt (2006).

6.1.4 Funktionelle Relevanz der Tiam1-Vinexin- β -Interaktion

6.1.4.1 *Stabile Überexpression und knockdown von Vinexin- β*

Nachdem im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl die Spezifität der Interaktion zwischen Tiam1 und Vinexin- β gezeigt werden konnte und zudem der Einfluss der Tiam1-Vinexin- β -Interaktion auf die Signalwege unterhalb von Rac untersucht wurde, wurden weiterhin die Effekte von Tiam1 und Vinexin- β auf die Migration und Invasion verschiedener Karzinomzelllinien untersucht.

Vinexin- β sollte in ausgewählten Karzinomzelllinien (clear-Ca28 (Niere), Dus-Col 1B (Kolon), PC-3 und LNCaP (Prostata)) stabil überexprimiert werden. Dazu wurde Myc-Vinexin- β in die retroviralen Expressionsvektoren pLZRS-IRESneo und pLZRS-IRESzeo einkloniert. Ein Nachteil dieser Vektoren stellte jedoch die Größe von ca. 13 kB dar. Zusammen mit dem Vinexin- β -Insert betrug die Größe der Plasmide sogar 14 kB. Das machte eine erfolgreiche Transfektion der Vektoren in die verschiedenen Zellen schwierig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien und auch Retroviren eingesetzt, um eine stabile Überexpression von Vinexin- β zu erreichen. Leider waren die Transfektionseffizienzen in clear-Ca28- und Dus-Col 1B-Zellen so gering, dass auch die wenigen Zellen, die die Plasmide aufgenommen hatten, die Selektion nicht überlebt haben. Daher sollte Vinexin- β in LNCaP-Zellen bzw. LNCaP C1199-Zellen stabil überexprimiert werden. Hier gelang es jedoch nur LNCaP C1199 Vinexin- β -Zellen zu generieren. Vermutlich war die Größe der zu transfizierenden Plasmide ein ausschlaggebender Grund für das Misslingen der stabilen Transfektionen.

Weiterhin wurde der knockdown von Vinexin- β in verschiedenen Karzinomzelllinien untersucht. Dazu wurde ein sh-Expressionsvektor verwendet, der stabil ins Genom der Zellen integriert werden sollte. Die Generierung stabiler Karzinomzelllinien war notwendig, da sich auch hier für die zu verwendenden Zelllinien (clear-Ca28, Dus-Col 1B, PC-3 und LNCaP) nach transienter Transfektion mit verschiedenen Transfektionsreagenzien nur sehr geringe Transfektionseffizienzen ergaben. Zudem sollte mit stabiler Gentransfektion gewährleistet werden, dass sich der erzielte Effekt in Hinblick auf die Vinexin- β -Herunterregulation konstant über mehrere Versuchstage hielt. Nachdem die shRNA und die shRNA-Kontrolle für

den *knockdown* von Vinexin- β generiert wurden, wurden beide Konstrukte transient in HEK293-Zellen transfiziert und der induzierte Vinexin- β -*knockdown* nach 48 bzw. 72 h sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene getestet. Leider war der für Vinexin- β kommerziell erhältliche Antikörper von relativ schlechter Qualität, so dass sich die endogene Expression von Vinexin- β nur schwer im erhaltenen Hintergrund detektieren ließ. Dennoch war 72 h nach der Transfektion eine deutliche Herabregulation von Vinexin- β zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten die RNA-Analysen bereits 48 h nach der Transfektion einen deutlichen *knockdown* von Vinexin- β , der sich jedoch schon einen Tag später so nicht mehr nachweisen ließ. Dieser Effekt ist damit zu erklären, dass der Vinexin- β -*knockdown* durch RNA-Interferenz zuerst einen direkten Effekt auf die Vinexin- β -spezifische mRNA hat. Diese wird durch den RISC-Komplex zerstört und kann somit nicht mehr in das Protein translatiert werden. Bereits 72 h nach der Transfektion wurde der shRNA-Expressionsvektor jedoch möglicherweise von zelleigenen DNAsen in den Zellen degradiert, so dass ein knockdown-Effekt auf die Vinexin- β mRNA nicht mehr nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu scheint Vinexin- β auf Proteinebene eine relativ lange Halbwertszeit zu haben, bevor es durch Proteasen abgebaut wird. Eine deutliche Herabregulation des Proteins nach transients Transfektion konnte erst nach 72 h beobachtet werden. Durch die beobachteten Effekte schien es umso wichtiger in den ausgewählten Zellen einen stabilen *knockdown* von Vinexin- β zu induzieren. Während der Versuche einen Satz stabil transfizierter Karzinomzellen für weiterführende Experimente zu erzeugen, konnte lediglich in LNCaP-Zellen ein stabiler *knockdown* von Vinexin- β erreicht werden. Der durch RNAi induzierte *knockdown* betrug auf RNA-Ebene ca. 40 %. Auf Proteinebene konnte nur eine sehr schwache Herabregulation von Vinexin- β detektiert werden. Das ist evtl. damit zu erklären, dass die Effektivität des *knockdowns* durch verschiedene Parameter beeinflusst werden kann. Die ausgewählte Sequenz zum *knockdown* von Vinexin- β wurde zwar von Mitsushima *et al.* übernommen aber aufgrund ihrer Größe für die shRNA-Klonierung an den Enden modifiziert. Daher ist es möglich, dass eine entsprechende Stabilität der shRNA in der Zelle nicht mehr gegeben war.

6.1.4.2 ***Einfluss von Vinexin- β auf die Migration und Invasion von COS-7-Zellen***

Da sich die Generierung transgener Zelllinien relativ schwierig gestaltete und für weitere Untersuchungen kein geeigneter Satz von zu untersuchenden Karzinomzellen erhalten ließ, wurde der Einfluss von Tiam1 und Vinexin- β in transient transfizierten COS-7-Zellen untersucht. Da in diesen Zellen immunologisch praktisch kein endogenes Vinexin- β

detektiert werden konnte, wurde für die folgenden Untersuchungen auf die Transfektion des shRNA-Konstrukts zum *knockdown* von Vinexin- β verzichtet. Obwohl Vinexin- β endogen in HEK293-Zellen exprimiert wird und in diesen Zellen ein *knockdown* von Vinexin- β gezeigt werden konnte, wurden die weiteren Untersuchungen aus den folgenden Gründen nicht in HEK293-Zellen durchgeführt, da sich diese Zellen lediglich gut für Experimente eignen, in denen das Verhalten der Zellen selbst nicht von Belang ist, also z. B. die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (Li *et al.*, 2006) oder die Untersuchung induzierbarer RNAi-Systeme (Amar *et al.*, 2006).

Der Effekt von Tiam1 und Vinexin- β wurde mit Hilfe eines *Transwell*-Systems untersucht. Dabei zeigte sich, dass Tiam1 tendenziell zu einer gesteigerten Migration von COS-7-Zellen führte. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Leng *et al.*, die nach transienter Transfektion von Tiam1 ebenfalls eine gesteigerte Migration von COS-7-Zellen beobachten konnten (1999). Die Tiam1-induzierte Migration konnte innerhalb dieser Versuche durch dominant negatives Rac1 T17N oder durch die Inhibition von MEK blockiert werden. Diese Daten belegen, dass die durch Tiam1-induzierte Zellmigration in COS-7-Zellen abhängig von Rac und auch von MAPK ist (Leng *et al.*, 1999). Gleichzeitig wurde keine Aktivierung von ERK durch Überexpression von Tiam1 festgestellt und diese Daten ließen sich durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen. Zudem konnte für Tiam1 auch in Schwann-Zellen eine gesteigerte Migration gezeigt werden, und ein *knockdown* für Tiam1 durch RNAi resultierte in einer Inhibierung der Migration (Yamauchi *et al.*, 2005). Für Vinexin- β konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Inhibierung der Migration von COS-7-Zellen gezeigt werden. Zudem hatte Vinexin- β auch einen inhibierenden Effekt auf die durch Tiam1-induzierte Migration. Bislang wurde der Effekt von Vinexin- β auf die Zellmigration in v-Src-transformierten NIH3T3-Zellen und der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP untersucht (Mizutani *et al.*, 2007; Umemoto *et al.*, 2009). Auch in diesen Zellsystemen hatte Vinexin- β einen inhibitorischen Effekt auf die Zellmigration. V-Src ist eine Tyrosin-Kinase, die eine wichtige Rolle in der Onkogenese spielt (Stehelin *et al.*, 1977). Durch v-Src werden z. B. ERK oder mTOR über den Ras/MAPK- oder PI3K/Akt-Signalweg aktiviert und diese Aktivierung resultiert in der Transformation von Zellen (Penuel *et al.*, 1999). In v-Src-transformierten NIH3T3-Zellen wurde die Expression von Vinexin- β unterdrückt. Eine anschließende Re-Expression von Vinexin- β führte jedoch zu einer Hemmung der Zellmigration, was darauf hindeutet, dass die Herunterregulation von Vinexin- β eine

wichtige Rolle in Bezug auf die onkogene Transformation spielen könnte (Umemoto *et al.*, 2009). Interessanterweise wird die Expression von Vinexin- β in nicht transformierten NIH3T3-Zellen durch die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF unterdrückt (Umemoto *et al.*, 2009). PDGF aktiviert sowohl mTOR als auch ERK, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass beide Signalwege in die Inhibierung der Vinexin- β -Expression mit eingebunden sein dürften (Umemoto *et al.*, 2009). Migrationsuntersuchungen in LNCaP-Zellen zeigten ebenfalls eine Hemmung der Migration durch Vinexin- β , das zuvor durch ERK phosphoryliert wurde (Mizutani *et al.*, 2007). Vinexin- β scheint daher in verschiedenen Zellsystemen einen hemmenden Einfluss auf die Zellmigration zu haben und hier insbesondere auch auf die Tiam1-induzierte Migration in COS-7-Zellen. Allerdings sollten weiterführende Untersuchungen die genaue Rolle für Vinexin- β in Bezug auf die Regulation des Cytoskeletts migrierender Zellen in unterschiedlichen Tumorzellen klären. In zukünftigen Experimenten sollte daher untersucht werden, ob sich die in COS-7-Zellen erzielten Ergebnisse auf weitere Zellsysteme und insbesondere auf Tumormodelle übertragen lassen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Arbeiten hinsichtlich der Invasion von COS-7-Zellen zeigten nach transienter Überexpression von Tiam1 und Vinexin- β weder ein erhöhtes Expressionslevel für TIMP-1 und -2 noch eine Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen (MMP)-2 und -9. Ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs zugunsten der MMPs führt zu einem invasiven Phänotyp von Zellen. Hier konnte kein Einfluss von Tiam1 und/oder Vinexin- β auf ein Ungleichgewicht in der Expression von MMPs und TIMPs festgestellt werden. Weder Tiam1 noch Vinexin- β scheinen daher eine Rolle für das Invasionspotential von COS-7-Zellen zu spielen. Tiam1 wurde als Gen identifiziert, das in einer murinen T-Lymphomzelllinie Invasion und Metastasierung induziert (Habets *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu inhibiert Tiam1 die Migration und Invasion epithelialer Zellen, indem es ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs zugunsten der TIMPs begünstigt (Engers *et al.*, 2001). Allerdings konnte im Gegensatz dazu in anderen Studien gezeigt werden, dass Tiam1 die Migration und Invasion epithelialer Zellen auch fördern kann (Attoub *et al.*, 2000; Keely *et al.*, 1997; Sander *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1997). Diese auf den ersten Blick sehr widersprüchlichen Effekte von Tiam1 in Bezug auf die Tumorzellmigration und -invasion epithelialer Zellen sind jedoch abhängig vom verwendeten Zelltyp und -substrat und auch von der Frage, ob unter den jeweiligen Versuchsbedingungen die Ausbildung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsion möglich ist oder nicht. Bei COS-7-Zellen handelt es sich um

Fibroblasten aus der Niere. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften für Tiam1 wäre es gut möglich, dass Tiam1 zwar die Migration dieser Zellen steigert, aber keinerlei Einfluss auf die Invasion derselben Zellen zu haben scheint. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe in clear-Ca-28-Zellen (Niere) mit konstitutiv aktivem C1199-Tiam1 ergaben jedoch jeweils gesteigerte Protein-Sekretionslevel für TIMP-1 und -2 und MMP-2 und -9 (Engers *et al.*, 2001).

Für Vinexin- β ist in der bislang veröffentlichten Literatur kein Effekt auf die Invasion von Zellen beschrieben. Experimente in Src-transformierten Zellen konnten jedoch zeigen, dass Src die Proteolyse von Komponenten der fokalen Adhäsionen beschleunigt, was weiterhin mit einer gesteigerten Motilität der Zellen und somit auch in gesteigerter Invasion resultiert (Carragher *et al.*, 2002). Zudem sind weitere Untersuchungen erforderlich, die die Rolle von der Vinexin- β -Phosphorylierung in Bezug auf die Funktionen von Vinexin- β klären.

6.2 Die Interaktion von Tiam1 mit Galectin-1

Aufgrund seiner bisher bekannten Funktionen könnte Galectin-1 eine wichtige Rolle in der Regulation des Tiam1/Rac-Signalwegs haben, denn auch Galectin-1 wird mit biologischen Prozessen wie Zellwachstum, maligner Transformation und Differenzierung in Verbindung gebracht (Camby *et al.*, 2006). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Interaktion von Tiam1 und Galectin-1 auf biochemischer Ebene und im Hinblick auf mögliche funktionelle Konsequenzen, sowie den Einfluss auf die Rac-vermittelte Signalweitergabe untersucht.

6.2.1 Charakterisierung der Tiam1-Galectin-1-Interaktion

Im Y2H zeigte die Interaktion von N853-Tiam1 und Galectin-1 mehrfach eine positive Galaktosidase-Aktivität, was auf eine Bindung beider Proteine hinweist (Engers *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Um ein Co-Lokalisation und somit Interaktion der beiden Proteine in Zellen zu bestätigen wurden Tiam1 und Galectin-1 alleine oder in Kombination transient in Rhabdomyosarkomzellen (BA-HAN-1C) transfiziert und die Lokalisation der Proteine in der Zelle anschließend mit Hilfe von konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Wie bereits mehrfach erwähnt, induziert Tiam1 einem charakteristischen „pfannkuchenartigen“ Phänotyp der Zelle und das sog. *membrane ruffling* (Michiels *et al.*, 1995). Auch in den untersuchten BA-HAN-1C-Zellen konnte nach Überexpression von Tiam1 dieser charakteristische Phänotyp beobachtet werden, wobei Tiam1 zum einen diffus im Cytoplasma der Zelle und zum anderen betont an der Zellmembran im Bereich der *membrane ruffles* lokalisiert war. Galectin-1 war hingegen ausschließlich im Cytoplasma der Zelle lokalisiert und hatte keinen Einfluss auf den ursprünglichen, Fibroblasten-Phänotyp der Zelle. Die Co-Expression von Tiam1 und Galectin-1 zeigt, dass beide Proteine im Bereich der Zellmembran co-lokalisiert sind. Dabei wurden jedoch weder der „pfannkuchenartige“ Aspekt der Zellen noch das *membrane ruffling* durch Galectin-1 in morphologisch fassbarer Form beeinflusst. Ähnlich wie für Vinexin- β könnte Tiam1 auch für Galectin-1 eine Art *shuttle*-Protein sein, das dafür sorgt, dass Galectin-1 aus dem Cytoplasma an die Zellmembran rekrutiert wird um dort mit anderen Proteinen (z. B. H-Ras-GTP) zu interagieren. Galectin-1 bindet bevorzugt an aktives Ras bzw. an konstitutiv aktives (=onkogenes) H-Ras G12V und eine Überexpression von Galectin-1 steigert die Membranassoziation von Ras und verlängert somit dort seine Aktivität, was nachfolgend zu einer Aktivierung von ERK und zu onkogener Zelltransformation führt (Paz *et al.*, 2001). Da

auch Tiam1 über seine RBD in der Lage ist mit aktivem Ras zu interagieren und diese Interaktion für die vollständige Ras-induzierte Rac-Aktivierung benötigt wird (Lambert *et al.*, 2002), wäre es durchaus denkbar, dass die Interaktion von Tiam1 mit Galectin-1 einen Einfluss auf die Tiam1-Ras-Bindung hat. Die Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigen deutlich, dass die Interaktion von Tiam1 und Galectin-1 in Zellen wahrscheinlich ist. Diese Ergebnisse wurden anschließend auf biochemischer Ebene mittels Co-Immunopräzipitation verifiziert. Galectin-1 konnte nach Co-Transfektion mit Tiam1 aus den Lysaten co-präzipitiert werden. Somit konnte die spezifische Interaktion von Tiam1 und Galectin-1 auch *in vitro* auf biochemischer Ebene gezeigt werden.

In weiterführenden Versuchen sollte die für die Bindung verantwortliche Tiam1-Domäne näher charakterisiert werden. Dazu wurden die in Abb. 5.3 dargestellten Tiam1-Deletionsmutanten zusammen mit Galectin-1 co-transfiziert und anschließend mittels konfokaler Lasermikroskopie bzw. Co-Immunopräzipitationsexperimenten untersucht. Dabei zeigte sich auf biochemischer Ebene, dass Galectin-1 zwar spezifisch an Tiam1 bindet, aber eine nähere Eingrenzung der verantwortlichen Tiam1-Domäne nicht ohne weiteres möglich war, da Galectin-1 z. B. auch mit der C580-Tiam1-Mutante co-präzipitiert werden konnte, obwohl dieses Konstrukt als interne Negativ-Kontrolle eingesetzt wurde. C-580-Tiam1 zeigte im Y2H zusammen mit Galectin-1 keine positive Galaktosidase-Aktivität, was darauf hinweist, dass hier keine Bindung der Proteine aneinander erfolgt (Engers *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Das Bindungsverhalten von Galectin-1 an die verschiedenen Tiam1-Konstrukte machte eine nachfolgende Interpretation schwierig, zumal regelmäßig eine Bindung an C580-Tiam1 nachgewiesen wurde. Auch die Interaktion von Galectin-1 mit den verschiedenen Tiam1-Mutanten zeigte je nach Versuch auch unter unterschiedlichen Pufferbedingungen unterschiedliches und damit schwer zu interpretierendes Bindungsverhalten. Die Interaktion von Galectin-1 an Volllängen-Tiam1 (FL) konnte jedoch reproduzierbar gezeigt werden. Möglicherweise ergaben sich für die verschiedenen Tiam1-Deletionsmutanten posttranslationale Modifikationen, die die eigentliche Bindedomäne überlagerten bzw. neue Bindungsmotive für Galectin-1 geschaffen haben. Auch die Untersuchungen in transient transfizierten BPH-Zellen konnten nicht eindeutig Aufschluss über die, für die Interaktion verantwortliche, Tiam1-Domäne geben. Eine eindeutige Charakterisierung des Bindungsverhaltens von Galectin-1 an Tiam1 sollte daher in nachfolgenden Arbeiten erfolgen. N853-Tiam1 zeigte im Y2H eine Bindung an Galectin-1 und

C-580-Tiam1 und Galectin-1 zeigten keine Interaktion. Um die für die Bindung verantwortliche Tiam1-Domäne näher zu charakterisieren, wäre es für weitere Untersuchungen denkbar, Y2H-Untersuchungen der vorhandenen Tiam-Konstrukte und Galectin-1 durchzuführen.

6.2.2 Die Interaktion von Galectin-1, Tiam1 und Ras

Sowohl Tiam1 als auch Galectin-1 interagieren hauptsächlich mit dem aktiven Ras-Onkoprotein (Paz *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2002). Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nur die Interaktion von Galectin-1 und Tiam1 analysiert, sondern auch untersucht, ob die Aktivierung von Ras Auswirkungen auf die Tiam1-Galectin-1-Interaktion hat bzw. ob eine Kompetition von Tiam1 und Galectin-1 um die Bindung an aktives Ras besteht. Die Effekte von Galectin-1 in Bezug auf die Tiam1-Ras-Bindung waren, abhängig vom verwendeten Zelltyp, inhibierend oder stimulierend. Während Galectin-1 unabhängig von EGF-Stimulation in COS-7-Zellen zu einer deutlichen Hemmung der Tiam1-Ras-Interaktion führte, so konnte die Bindung zwischen Tiam1 und Ras in HEK293-Zellen durch die Expression von Galectin-1 deutlich gesteigert werden. Die Galectin-1-Ras-Interaktion durch Tiam1 wurde, unabhängig von der Stimulation des EGF-Rezeptors, nicht eindeutig beeinflusst. Eine Aktivierung von Ras durch EGF-Stimulation führte in COS-7-Zellen jedoch tendenziell zu einer gesteigerten Bindung von Galectin-1 an Tiam1. In denselben Zellen verhinderte Galectin-1 die Tiam1-Ras-Bindung, so dass keine Kompetition um den Bindungspartner Ras wohl aber um Tiam1 als Interaktionspartner zu bestehen scheint. Der Ansatz, dass Tiam1 als *shuttle*-Protein für Galectin-1 dafür sorgt, dass Galectin-1 an die Membran rekrutiert wird, um dort mit anderen Proteinen zu interagieren wird durch diese Ergebnisse relativiert. Durch Tiam1 wurde zumindest die Ras-Galectin-1-Interaktion nicht beeinflusst. Die Lokalisation von Tiam1 an der Zellmembran wird durch den myristoylierten N-Terminus von Tiam1 stabilisiert (Habets *et al.*, 1994). Prior *et al.* beschreiben, dass Galectin-1 durch die Bindung an H-Ras-GTP aus dem Cytoplasma an die Zellmembran gebracht wird (2003). Dort sorgt Galectin-1 dafür, dass die Stabilisierung von H-Ras-GTP an der Zellmembran verlängert und die Stabilität von H-Ras-Nanoclustern an der Membran gesteigert werden (Prior *et al.*, 2003; Belanis *et al.*, 2008). Zudem lenkt Galectin-1 die Ras-vermittelten Signalweiterleitung selektiv in Richtung Raf-1 und ERK (Camby *et al.*, 2006). Durch die Rekrutierung von Galectin-1 an die Membran durch H-Ras könnte Galectin-1 in räumliche Nähe zu membrangebundenen Tiam1 kommen und daran binden.

6.2.3 Einfluss von Tiam1 auf die Sekretion von Galectin-1

Galectin-1 hat sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Funktionen. Obwohl Galectin-1 durch einen acetylierten N-Terminus und fehlende Glycosylierung die erkennbaren Signalsequenzen für eine Sekretion fehlen, so wird Galectin-1 doch im Extrazellularraum verschiedener normaler und neoplastischer Gewebe detektiert (Clerch *et al.*, 1988; Camby *et al.*, 2006). Extrazellulär vorkommendes Galectin-1 steigert die Zelladhäsion an Matrixproteine wie Fibronectin oder Laminin (Moiseeva *et al.*, 1999; van den Brule *et al.*, 1995; van den Brule *et al.*, 2003). Auch für Tiam1 wurde in Nierenkarzinomzellen eine erhöhte Zell-Substrat-Adhäsion an Laminin beobachtet (Engers *et al.*, 2001).

Um in den extrazellulären Raum sekretiert werden zu können muss Galectin-1 möglicherweise stabil über einen längeren Zeitraum in räumliche Nähe zur Membran gebracht werden. Das Protein selbst besitzt jedoch keine Sekretions-Signalsequenz und wird zudem nicht über den klassischen ER/Golgi-Signalweg sekretiert. Galectin-1 wird durch seine Interaktion mit H-Ras an die Zellmembran gebracht. Dort kann es durch die Interaktion mit Tiam1 unter Umständen über einen längeren Zeitraum stabilisiert werden um anschließend in den Extrazellularraum sekretiert zu werden. Der genaue Mechanismus, der für den Export von Galectin-1 in den Extrazellularraum verantwortlich ist, ist bislang nicht vollständig geklärt, allerdings gibt es Hinweise, dass die Na^+/K^+ -ATPase in diesen Prozess involviert sein könnte (Nickel *et al.*, 2005). Durch die intrazelluläre Interaktion von Tiam1 und Galectin-1 könnte die Sekretion von Galectin-1 in den Extrazellularraum beeinflusst werden. Durch Co-Transfektion von Galectin-1 mit verschiedenen Tiam1-Deletionsmutanten wurde der Effekt der einzelnen Tiam1-Deletionsmutanten auf die Sekretion von Galectin-1 untersucht. Dabei fiel auf, dass Vollängen-Tiam1 im Vergleich zum leeren Vektor keinen Einfluss auf die Sekretion von Galectin-1 hatte. Die Konstrukte C1199-, N853-, N420- und PHn-CC-Ex-Tiam1 führten jedoch zu einer deutlichen gesteigerten Sekretion von Galectin-1.

Rotblat *et al.* identifizierten eine hydrophobe Tasche in Galectin-1 (2004). Durch L11A-Substitution wurde die Isoprenoid-bindende Funktion von Galectin-1 verändert, ohne die Carbohydrat-bindende Domäne (CRD) oder die Bindung an H-Ras zu beeinflussen. Allerdings konnten die H-Ras-Galectin (L11A)-Komplexe nicht mehr an der Zellmembran, sondern lediglich im Cytoplasma detektiert werden, so dass auch keine Stabilisierung von H-Ras-GTP durch Galectin-1 an der Membran erfolgen kann (Rotblat *et al.*, 2004; Camby *et al.*, 2000).

Aus dem positiven H-Ras-Regulator wurde so ein interferierendes Protein, dass auch die Ras-vermittelte ERK-Aktivierung blockierte (Rotblat *et al.*, 2004). In den Experimenten zu der vorliegenden Arbeit haben Bindungsanalysen durch Co-Immunopräzipitation von Tiam1 und der dominant negativen Galectin-1-Substitutionsmutante Galectin-1(L11A) keine Interaktion der beiden Proteine zeigen können. Auch die Sekretion von Galectin-1(L11A) wurde nach Co-Transfektion mit Tiam1 nicht beobachtet. Für eine Membrantranslokation und die nachfolgende Sekretion von Galectin-1 ist offenbar sowohl die Interaktion von Galectin-1 mit Ras als auch die mit Tiam1 von Bedeutung (Paz *et al.*, 2001;). Co-Transfektionen der verschiedenen Tiam1-Konstrukte zusammen mit Galectin-1(L11A) zeigten, dass keine der Tiam1-Mutanten die Sekretion von Galectin-1(L11A) beeinflusste.

6.2.4 Funktionelle Bedeutung der Tiam-1-Galectin-1-Interaktion für die Rac-vermittelte Signalweitergabe

Die spezifische Interaktion von Tiam1 und Galectin-1 konnte in Zellen und *in vitro* belegt werden. In weiterführenden Experimenten wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Galectin-1 auf die Tiam1-induzierte Rac-Aktivierung und die Tiam1/Rac-vermittelten Signalwege in COS-7- und in HEK293-Zellen untersucht.

Tiam1 katalysiert spezifisch den GDP/GTP-Austausch der Rho-ähnlichen GTPase Rac und zusammen regulieren Tiam1 und Rac wichtige zelluläre Prozesse bezüglich maligner Transformation, Tumorprogression und Metastasierung (Buchanan *et al.*, 2000; Fleming *et al.*, 2000). Da die Aktivierung der Rac-nachgeschalteten Signalwege abhängig vom verwendeten Zelltyp ist, wurden die Untersuchungen im Bezug auf die Rac-Aktivierung und die Vermittlung der nachgeschalteten Signalwege in den o. g. Zellsystemen untersucht. Konstitutiv aktives C1199-Tiam1 führte sowohl in COS-7-Zellen als auch in HEK293-Zellen zu einer deutlichen Aktivierung von Rac. Auch Vollängen- Tiam1 zeigte eine Rac-Aktivierung, die in COS-7-Zellen jedoch nur sehr schwach ausfiel. Galectin-1 hatte selbst keinen Einfluss auf die Aktivierung von Rac. Hier resultierte die Co-Transfektion von Tiam1 und Galectin-1 in einer geringeren Rac-Aktivierung als im Vergleich zu Tiam1 alleine. Dieser Effekt wurde jedoch nicht als inhibierender Einfluss von Galectin-1 auf den Tiam1-Effekt gewertet. Vielmehr ist der schwächere Tiam1-Effekt wahrscheinlich durch die deutlich geringere Expression von Tiam1 in den mit Galectin-1 co-transfizierten Ansätzen zu erklären. Außerdem deuten Ergebnisse von Gomez del Pulgar *et al.* darauf hin, dass Galectin-1 in der Signalkaskade nicht oberhalb von Rac und Tiam1 einzuordnen ist, sondern eher in den

nachgeschalteten Rac-vermittelten Signalwegen eine wichtige Rolle spielt (2007). Durch quantitative Echtzeit-PCR fand man heraus, dass die Überexpression von Rac nicht nur die Signalwege stimuliert, die in die Kontrolle des Actin-Cytoskeletts eingreifen, sondern auch die Expression bestimmter Gene regulieren kann, die wie Galectin-1 in die Regulation der Metastasierung eingebunden sind (Gomez del Pulgar *et al.*, 2007). In SW260-Zellen wird die Expression von Galectin-1-mRNA durch Rac auf einen fast 6-fachen Wert gesteigert (Gomez del Pulgar *et al.*, 2007). Allerdings sind die in die Regulation eingebundenen Effektoren bzw. Transkriptionsfaktoren, die die Rac-induzierte Expression von Galectin-1 beeinflussen, bislang nicht bekannt (Gomez del Pugar *et al.*, 2007).

Unabhängig von den, im Rac-Aktivitätsassay, erzielten Ergebnissen wurde dennoch der Einfluss der Galectin-1-Tiam1-Interaktion zusätzlich auf die Aktivität der Signalwege unterhalb von Rac in HEK293- und COS-7-Zellen und ohne Stimulation des EGF-Rezeptors untersucht. Die Effekte, die Tiam1 auf die jeweiligen nachgeschalteten Rac-vermittelten Signalwege hatte, wurden bereits in den jeweiligen Kapiteln 5.1.6.1 besprochen und werden hier daher nicht noch einmal diskutiert. In den untersuchten Signalwegen unterhalb von Rac hatte Galectin-1 keine eindeutigen Effekte in COS-7- und in HEK293-Zellen. Teilweise vermeindliche Abschwächungen der durch Tiam1 induzierten Effekte wurden nicht als direkter Einfluss von Galectin-1 gewertet. Vielmehr korrelieren diese Effekte mit der geringeren Tiam1-Expression in den mit Galectin-1 co-transfizierten Ansätzen. Die bisher beschriebenen Effekte von Galectin-1 auf die Signalwege innerhalb der Zelle beziehen sich vornehmlich auf die Interaktion zwischen Galectin-1 und Ras. und wurden bereits diskutiert (siehe 6.2.2). Galectin-1 hat sowohl intra- als auch extrazelluläre Funktionen und in den bisher veröffentlichten Publikationen wurde zumeist die extrazelluläre Funktion auf die Signalwege innerhalb der Zelle untersucht. So bindet Galectin-1 in Endothelzellen direkt an Neuropilin-1 (NRP1), einen Membranrezeptor für VEGF und verschiedene Semaphorine (Hsieh *et al.*, 2008; Soker *et al.*, 1998). NRP1 wird mit zellbiologischen Prozessen wie der Angiogenese, Migration und Invasion in Verbindung gebracht und die direkte Interaktion mit Galectin-1 begünstigt die Aktivierung der nachgeschalteten NRP1/VEGF-2 Signalkaskade, die unter anderem für die Bildung neuer Blutgefäße verantwortlich ist (Hsieh *et al.*, 2008). Die externe Stimulation von Thymuszellen und PSC-Zellen mit rekombinantem Galectin-1 resultiert durch die Aktivierung von ERK in einer gesteigerten Proliferation der Zellen (Liu *et al.*, 2008; Masamune *et al.*, 2006). Außerdem konnte durch rekombinantes Galectin-1 die

Produktion von Chemokinen durch eine Aktivierung von NF- κ B und z. T. auch durch die Aktivierung von der c-Jun-Kinase oder ERK induziert werden (Masamune *et al.*, 2006). Durch Thiogalaktoside kann die β -Galaktosid-Bindefähigkeit von Galectin-1 inhibiert und die durch Galectin-1 induzierten Effekte unterdrückt werden. Dies impliziert eine wichtige Rolle für die extrazellulären, Kohlenhydrat-abhängigen Funktionen von Galectin-1 in Bezug auf die Chemokin-Produktion und die Proliferation in PSC-Zellen (Masamune *et al.*, 2006). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression bzw. die Funktionen von Galectin-1 eher durch intrazelluläre Signalweiterleitung, wie z. B. NF- κ B, ERK, p38 oder die p70S6-Kinase kontrolliert wird (Fuertes *et al.*, 2004; Koh *et al.*, 2009). NF- κ B induziert über die p38-Signalweiterleitung eine Herunterregulation von CD7, einem wichtigen Rezeptor für Galectin-1. Dadurch entgehen T-Lymphomzellen der Galectin-1-induzierten Apoptose (Koh *et al.*, 2008). Lediglich Untersuchungen in murinen, embryonalen Stammzellen zeigen, dass intrazelluläres Galectin-1 an der Aktivierung von Akt und mTOR beteiligt ist und so zu einer gesteigerten DNA-Synthese in diesen Zellen führt (Lee *et al.*, 2009). Die bislang evaluierten positiven und negativen Effekte von Galectin-1 in Bezug auf seine Funktionen sind extrem abhängig vom verwendeten Zelltyp, aber auch davon ob Galectin-1 intrazellulär oder extrazellulär bzw. als Mono- oder Dimer vorliegt (Camby *et al.*, 2006). Während extrazellulär vorliegendes Galectin-1 das Wachstum von Kolonkarzinomzellen nicht beeinflusst, wird die Wachstumsrate in Lymphknotenzellen gesteigert und die in Neuroblastomzellen gehemmt (Hittelet *et al.*, 2003; Moiseeva *et al.*, 2000; Kopitz *et al.*, 2001). Zudem sind die oben beschriebenen Effekte von Galectin-1 in Bezug auf das Zellwachstum abhängig von der eingesetzten Dosis des Proteins. Während hohe Dosen (ca. 1 μ M) von rekombinantem Galectin-1 die Zellproliferation unabhängig von der Galaktosid-bindenden Fähigkeit von Galectin-1 inhibieren, sorgt Galectin-1 in Konzentrationen von ca. 1 nM dafür, dass das Zellwachstum Kohlenhydrat-abhängig gesteigert wird (Camby *et al.*, 2006). Weitere Untersuchungen sind nötig, um die intrazelluläre Funktion von Galectin-1 und seine Funktion als Interaktionspartner Tiam1 besser charakterisieren zu können.

6.2.5 Funktionelle Relevanz der Tiam1-Galectin-1-Interaktion

6.2.5.1 Stabile Überexpression und knockdown von Galectin-1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die spezifische Interaktion von Tiam1 und Galectin-1 sowohl in Zellen als auch *in vitro* gezeigt werden. Zudem wurde der Einfluss von

Galectin-1 auf die Rac-vermittelten nachgeschalteten Signalwege untersucht. Galectin-1 hat weder selbst einen Effekt auf die Rac-vermittelte Signalweitergabe ausgeübt, noch den durch Tiam1 induzierten Effekt in irgendeiner Form beeinflusst. Da für Galectin-1 jedoch bereits unterschiedliche Einflüsse auf das biologische Verhalten maligner Tumore beschrieben wurden, sollte der Effekt von Galectin-1 im Hinblick auf die Migration und Invasion in unterschiedlichen Karzinomzelllinien untersucht werden.

Dazu wurde Galectin-1 analog zu Vinexin- β in einem ersten Versuchsansatz zusammen mit einer Myc-Tag-Sequenz in die retroviralen Expressionsvektoren pLZRS-IRESneo und pLZRS-IRESzeo umkloniert, um Galectin-1 so in ausgewählten Karzinomzelllinien (clear-Ca28, DUS-Col 1B und PC-3) stabil überexprimieren zu können. Obwohl die Transfektionen unter dem Einsatz verschiedener kommerziell erhältlicher Transfektionsreagenzien und Retroviren durchgeführt wurden, waren die erreichten Transfektionseffizienzen so gering, dass die Zellen unter dem Selektionsdruck starben. Auf der anderen Seite konnten sehr häufig unter Selektionsdruck Zellpools generiert werden, die zwar das Plasmid aufgenommen hatten, in denen immunologisch oder mittels quantitativer RT-PCR aber keine stabile Überexpression von Myc-Galectin-1 nachweisbar war. Dies war jedoch nicht auf den genetischen Verlust des Vektors zurückzuführen, denn die Zellen nutzten weiterhin die Resistenzgene, um unter dem Selektionsdruck zu proliferieren. Die Zusammensetzung des Vektors ist von großer Bedeutung für die Stabilität der Expression (Lim *et al.*, 1989; Correll *et al.*, 1994; Woods *et al.*, 2000). Eine Ursache für den Ausfall der Myc-Galectin-1-Überexpression könnte am eingesetzten Promotor liegen. Die eingesetzten pLZRS-IRES-Vektoren stehen unter der Kontrolle eines PGK-Promotors. Untersuchungen zeigten, dass die Expression von Konstrukten, die unter der Kontrolle eines PGK-Promotors stehen, weit häufiger gelöscht wird als im Vergleich zu solchen, die unter der Kontrolle eines CMV-Promotors stehen (Frank, 2000, Tybulewicz *et al.*, 1991).

Parallel sollte in einem weiteren Versuchsansatz die Expression von Galectin-1 durch RNA-Interferenz spezifisch herabreguliert werden. Dazu wurden shRNA generiert und in einen pRETROSUPER-Vektor einkloniert, der sich stabil ins Genom der Zellen integrieren lässt. Nachdem die shRNA für Galectin-1 bzw. das entsprechende Kontrollkonstrukt (scr-shRNA) generiert war, wurden beide Konstrukte transient in COS-7-Zellen transfiziert und der *knockdown* für Galectin-1 auf Proteinebene getestet. Sowohl die Klonierung der shRNA für

Galectin-1 als auch der scr-shRNA-Kontrolle waren erfolgreich. Auch noch fünf Tage nach der transienten Transfektion konnte immunologisch eine deutliche Herunterregulation von Galectin-1 nachgewiesen werden. Auch hier konnte Galectin-1 nicht stabil in verschiedenen Karzinimzelllinien herunterzuregulieren werden. Die Untersuchungen auf den Einfluss von Galectin-1 auf die Zellmigration und Invasion wurden in transient transfizierten COS-7-Zellen durchgeführt.

6.2.5.2 ***Einfluss von Galectin-1 auf die Migration und Invasion von COS-7-Zellen***

Der Effekt von konstitutiv aktivem C1199-Tiam1 und Galectin-1 auf die Zellmigration wurde mit Hilfe eines *Transwell*-Systems untersucht. Es zeigte sich für überexprimiertes C1199-Tiam1 eine tendenzielle Migrationssteigerung der COS-7-Zellen. Galectin-1 führt in unterschiedlichen Zelltypen zu einer Migrationssteigerung und beeinflusst zudem die Invasion von Tumorzellen (Spano *et al.*, 2010; Alge-Priglinger *et al.*, 2009; Fulcher *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2008; Rabinovich, 2005). Die Migration von Zellen ist das Ergebnis aus Adhäsion, Beweglichkeit und Invasion. Galectin-1 ist in der Lage jeden einzelnen dieser biologischen Prozesse zu beeinflussen (Decaestecker *et al.*, 2006; Camby *et al.*, 2006). U. a. fanden Hittelet *et al.*, heraus, dass die Galectin-1-Expression in humanen Kolon-Karzinomzellen zur Proliferation bzw. zur Migration von Zellen führt (Hittelet *et al.*, 2003; Horiguchi *et al.*, 2003). Die Migrationsuntersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten keinen Effekt von Galectin-1 auf die Zellmigration von COS-7-Zellen. Zusammen mit einer Überexpression von C1199-Tiam1 wurde durch Galectin-1 die Tiam1-induzierte Migration der COS-7-Zellen weiter gesteigert. Vorbehaltlich wird für Galectin-1 daher auch ein stimulierender Effekt auf die Migration von COS-7-Zellen angenommen. Dies sollten jedoch weiterführende Untersuchungen klären. Obwohl die genauen Mechanismen, die zu Galectin-1-induzierter Tumorzellmigration führen, bisher nicht abschließend verdeutlicht wurden, nimmt man an, dass Galectin-1 die Motilität der Zellen durch die Bindung an Oberflächenglykoproteine beeinflusst (Rabinovich, 2005). Zudem scheint Galectin-1 ganz entscheidend in die Angiogenese involviert zu sein, denn Galectin-1 ist in Blutgefäßen überexprimiert, die mit Tumorzellen verbunden sind und kann die Interaktion zwischen Tumorzellen und Endothelzellen *in vitro* vermitteln und die Ausbreitung der Tumorzellen in andere Gewebe begünstigen (Clausse *et al.*, 1999; Glinski *et al.*, 2000).

Die Untersuchungen zur Invasion von Zellen wurden über die Expression der MMPs -2 und -9, sowie durch die Expression ihrer Antagonisten TIMP-1 und -2 analysiert. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit transient überexprimiertem Vollängen-Tiam1, zeigte sich nach Überexpression der konstitutiv aktiven C1199-Tiam1-Mutante eine gesteigerte Sekretion von TIMP-1 und -2 aber auch von MMP-2 und -9. Allerdings wurden weder die aktiven Formen Pro-MMP-2 und -9 noch ein Ungleichgewicht in der Expression detektiert. Frühere Untersuchungen in clear-Ca-28-Zellen mit konstitutiv aktivem C1199-Tiam1 ergaben ebenfalls gesteigerte Protein-Sekretionslevel für TIMP-1 und -2 und MMP-2 und -9 (Engers *et al.*, 2001). Die für Tiam1 publizierten Daten sind auf den ersten Blick sehr widersprüchlich. Tiam1 ist in der Lage die Migration und Invasion epithelialer Zellen zu fördern (Habets *et al.*, 1994; Michiels *et al.*, 1995). Gleichzeitig zeigen andere Studien, dass Tiam1 eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen MMPs und TIMPs zugunsten der TIMPs begünstigt und dadurch die Invasion inhibiert (Hordijk *et al.*, 1997; Engers *et al.*, 2001). Allerdings müssen bei der Interpretation der unterschiedlichen Effekte von Tiam1 der verwendete Zelltyp, das Zellsubstrat und die Möglichkeit zu E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsion berücksichtigt werden. Galectin-1 wurde bereits im Jahr 2001 mit Tumormetastasierung und Invasion in Verbindung gebracht (Harvey *et al.*, 2001). Dabei fand man heraus, dass an der Plasmamembran vorkommendes Galectin-1 als ein Marker für die Invasionsfähigkeit von Zellen gesehen werden kann (Harvey *et al.*, 2001). Die transiente Überexpression von Galectin-1 in COS-7-Zellen führte zu einer gesteigerten Sekretion von MMP-9 und tendenziell zu einer gesteigerten Sekretion von MMP -2. Untersuchungen in der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie OC-2 zeigten, dass die Expression von Galectin-1 zu einem Anstieg der MMP-2 und -9-Sekretion führte und zudem durch Änderungen der bestehenden Cytoskelettstruktur für eine gesteigerte Tumorzelladhäsion, Migration und Invasion verantwortlich ist (Wu *et al.*, 2009). Der in COS-7-Zellen beobachtete Anstieg der MMP-Sekretion korrelierte allerdings mit einer gesteigerten Sekretion der TIMPs, so dass kein Ungleichgewicht zwischen den invasionsfördernden MMPs und TIMPs festzustellen war. Die Überexpression von Galectin-1 alleine hatte in COS-7-Zellen weder einen Effekt auf das Migrations- noch auf das Invasionspotential der Zellen. Da die Co-Expression von Tiam1 und Galectin-1 zwar ebenfalls zu einer gesteigerten MMP-2-Sekretion führte, aber die Sekretion von TIMP-2 nicht gesteigert wurde, ist anzunehmen, dass das invasive Potential von Zellen gesteigert wird, sobald Tiam1 und Galectin-1 gemeinsam in den Zellen überexprimiert

werden. Die bisher durchgeführten Untersuchungen zum Migrations- und Invasionsverhalten unter Galectin-1-Expression beziehen sich nahezu durchgehend auf verschiedene Tumormodelle, was sicherlich auch sinnvoll ist. Dabei wurde die Expression von Galectin-1 in verschiedenen malignen Tumoren beobachtet und eine Korrelation zwischen Galectin-1-Expression und der Metastasierungsfähigkeit beobachtet, so dass eine Überexpression von Galectin-1 eine schlechte Prognose für die Patienten bedeutet (van den Brule *et al.*, 1996; Gillenwater *et al.*, 1996; Cindolo *et al.*, 1999; Sanjuan *et al.*, 1997; Rorive *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2007; Cimmino *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2010; Spano *et al.*, 2010). Um das Zusammenspiel von Tiam1 und Galectin-1 in Bezug auf die Tumormetastasierung jedoch besser verstehen zu können sind weitere Untersuchungen in den entsprechenden Tumormodellen unabdingbar.

7 Zusammenfassung

Tiam1 ist ein spezifischer Aktivator der kleinen GTPase Rac. Tiam1 und Rac regulieren wichtige zelluläre Prozesse bezüglich maligner Transformation, Tumorprogression und Metastasierung. Trotz dieser wichtigen Funktionen für Tiam1 ist bislang nur wenig darüber bekannt, wie seine Aktivität reguliert wird. In Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit wurden das Adapter-Protein Vinexin- β (Vin- β) und das Lectin Galectin-1 (Gal-1) mittels eines Y2H in einer humanen cDNA- Bank der Niere als neue Bindungspartner für Tiam1 identifiziert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktionen zwischen Tiam1 und den beiden neu identifizierten Bindungspartnern zu charakterisieren und hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung für die Tiam1/Rac-Signaltransduktion zu untersuchen. Um die Bedeutung der Tiam1-Vin- β -Interaktion näher zu analysieren, wurde zunächst die Lokalisation beider Proteine in BA-HAN-1C Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine Interaktion beider Proteine im Cytoplasma der Zellen und in den Tiam1-induzierten Membrankräuselungen. Dabei hatte Vin- β keinen Einfluss auf den von Tiam1 induzierten Phänotyp der Zelle. Die spezifische Bindung von Vin- β an Tiam1 konnte zudem durch Co-Immunopräzipitation bestätigt werden. Interessanterweise wurde die Tiam1-Vin- β -Interaktion durch die EGF-induzierte Aktivierung von Ras gesteigert. Zusätzlich hemmte Vin- β unabhängig von EGF-Stimulation die Bindung von Tiam1 an Ras-GTP. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass Vin- β auch die Tiam1/Rac- induzierten Aktivierungen der Serin/Threonin Protein Kinase Akt und des c-fos Serum Response Elements (SRE) hemmte und damit die Signalwege unterhalb von Rac selektiv beeinflusst. Die Untersuchungen zur funktionellen Relevanz dieser Interaktion zeigten, dass weder Tiam1 noch Vin- β einen Einfluss auf das Invasionsverhalten von COS-7-Zellen hatte. Die Tiam1-induzierte Migration dieser Zellen wurde jedoch durch Vin- β gehemmt. Die Ergebnisse zeigen, dass das Adapter-Protein Vin- β ein neuer Bindungspartner von Tiam1 ist, der die selektive Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege von Tiam1 und Rac zumindest teilweise beeinflusst. Zudem wurde eine mögliche Verbindung zwischen dem EGF-R- und dem Tiam1-Rac-Signalweg aufgezeigt. Die Tiam1-Gal-1-Interaktion wurde zunächst ebenfalls auf eine Co-Lokalisation in Zellen untersucht. Diese fand sich im Cytoplasma und in den Tiam1-induzierten Membrankräuselungen. Dabei hatte Gal-1 keinen Einfluss auf den Tiam1-

induzierten Phänotyp der Zellen. Die Spezifität der Tiam1-Gal-1-Interaktion wurde anschließend durch Co-Immunopräzipitation verifiziert. Im Gegensatz zu Vin-β hatte Gal-1 jedoch keinen Einfluss auf die Tiam1 vermittelten Signalwege unterhalb von Rac in COS-7- und HEK293-Zellen. Galectin-1 hat sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Funktionen und durch Co-Transfektion von Galectin-1 mit verschiedenen Tiam1-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von Galectin-1 deutlich durch Tiam1-Mutanten gesteigert wurde, die den N-Terminus und / oder die PHn-CC-Ex-Domäne beeinhalteten. Es gibt Hinweise, dass Galectin-1 durch eine direkte Translokation entlang der Plasmamembran sezerniert wird. Daher wird angenommen, dass Galectin-1 durch die Interaktion mit Tiam1 an der Zellmembran stabilisiert wird, um anschließend in den Extrazellularraum sekretiert zu werden. In funktionellen Untersuchungen konnte kein Effekt von Gal-1 auf die Migration von COS-7-Zellen gezeigt werden. Allerdings führte die Co-Expression von Tiam1 und Gal-1 zu einem Ungleichgewicht in der Expression von invasionsfördernden MMPs zu TIMPs, so dass das invasive Potential der Zellen nach Überexpression von Tiam1 zusammen mit Gal-1 zunimmt. Die Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass Gal-1 möglicherweise in der Signalweiterleitung unterhalb von Tiam1 und Rac anzuordnen ist.

8 Summary

Tiam1 is a specific activator of the Rho-like GTPase Rac and Tiam1/Rac signaling plays a major role in malignant transformation, migration, invasion and metastasis. Despite these important functions, the molecular mechanisms regulating Tiam1 activity are only poorly understood. By using Tiam1 as bait in an Y2H of a human kidney cDNA library, the adaptor protein Vinexin- β (Vin- β) and the lectin Galectin-1 (Gal-1) were identified as potential new binding partners of Tiam1. The aim of this work was to verify the Tiam1-Vin- β - and Tiam1-Gal-1 interaction respectively on the protein level with regard to potential functional consequences. Co-transfection of Tiam1/Vin- β and subsequent laser scanning microscopy of BA-HAN-1C cells revealed co-localization of both proteins in the cytoplasm as well as in Tiam1-induced membrane ruffles. However, Vin- β had no effects on the Tiam1-induced alterations of the actin cytoskeleton. Biochemically, the specific interaction of Tiam1 and Vin- β was verified by co-immunoprecipitation studies. Interestingly, binding of Vin- β to Tiam1 could be stimulated by epidermal growth factor (EGF). At the same time Vin- β inhibited the Tiam1-interaction with Ras-GTP independently upon EGF-stimulation. Furthermore Vin- β was likely to inhibit Tiam1/Rac-mediated activation of the serine/threonine protein kinase Akt and the c-fos serum response element (SRE). Moreover Vin- β inhibited Tiam1-induced migration in COS-7-cells while neither Tiam1 nor Vin- β might affect invasion of COS-7-cells. These results suggest that the adaptor protein Vin- β is a new binding partner of Tiam1 who may direct Tiam1/Rac signaling towards specific downstream signalling pathways. This provides a new molecular link between growth factor-dependent signaling and Tiam1/Rac signaling. Investigation of the Tiam1-Gal-1 interaction also revealed co-localisation of both proteins in the cytoplasm as well as in Tiam1-induced membrane ruffles of BA-HAN-1C cells. Gal-1 did not affect the Tiam1-induced phenotype of the cells in any direction. The specific interaction of Tiam1 and Gal-1 was confirmed by using co-immunoprecipitation. In contrast to Vin- β Gal-1 had no detectable effects on Tiam1-mediated Rac downstream signaling pathways in COS-7 and HEK293 cells. The intracellular and extracellular activity of Gal-1 has been described. After co-transfection of Gal-1 with different Tiam1 deletion mutants we could show that secretion of Gal-1 is enhanced by Tiam1 mutants that contain the N-terminus and/or the PHn-CC-Ex-domain. There is evidence

that Gal-1 is secreted via direct translocation across the plasma membrane and we assume that Gal-1 is stabilized at the plasma membrane through its interaction with Tiam1. Finally, while Gal-1 had no effect on migration of COS-7 cells, co-expression of Tiam1 and Gal-1 led to imbalances between MMP and TIMP expression which might be a hint for increased invasion of these cells.

9 Literaturverzeichnis

- Abankwa, D., Gorfe, A.A., Inder, K. and Hancock, J.F. (2010) Ras membrane orientation and nanodomain localization generate 167inculi diversity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 1130-1135.
- Adams, L., Scott, K. G. and Weinberg, C. S. (1996) Biphasic modulation of cell growth by recombinant human Galectin-1. *Biochim Biophys Acta*, **1312**, 137-144.
- Ahmad, N., Gabius, H. J., Sabesan, S., Oscarson, S. and Brewer, C. F. (2004) Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to Galectin-1, Galectin-3 and the carbohydrate recognition domain of Galectin-3. *Glycobiology*, **14**, 817-825
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell, 4th Edition, *Garland Science*.
- Alge-Priglinger, C.S., André, S., Kreutzer, T.C., Deeg, C.A., Kampik, A., Kernt, M., Schöffl, H., Priglinger, S.G., Gabius, H.J. (2009) Inhibition of human retinal pigment epithelial cell attachment, spreading, and migration by the human lectin Galectin-1. *Mol Vis.*; **15**, 2162-73.
- Almkvist, J. and Karlsson, A. (2004) Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J.*, **19**, 575-581.
- Amar, L., Desclaux, M., Faucon-Biguët, N., Mallet, J., Vogel, R. (2006) Control of small inhibitory RNA levels and RNA interference by doxycycline induced activation of a minimal RNA polymerase III promoter. *Nucleic Acid Res.*, **34**(5), e37.
- Amer, J., Goldfarb, A. and Fibach, E. (2003) Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. *Eur J Haematol*, **70**, 84-90.
- Ashery, U., Yizhar, O., Rotblat, B., Elad-Sfadia, G., Barkan, B., Haklai, R. and Kloog, Y. (2006) Spatiotemporal organization of Ras Galectin: Rasosomes and the Galectin switch. *Cell Mol. Neurobiol.*, **26**, 469-493.
- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology; www.atlasgeneticsoncology.org
- Attoub, S., Noe, V., Pirola, L., Bruyneel, E., Chastre, E., Mareel, M., Wymann, M.P., Gespach, C. (2000) Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3- kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *FASEB J*, **14**, 2329-38.
- Baldino, F., Chesselet, M.F. and Lewis, M. E. (1989) High- resolution in situ hybridization histochemistry. *Meth. Enzymol.*, **168**, 768-777.
- Barondes, S. H. (1997) Galectins: A personal overview. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **9**, 1-7.
- Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K. *et al.* (1994) Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*, **76**, 597-598.
- Barondes, S. H., Cooper, D. N., Gitt, M. A and Leffler, H. (1994) Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol. Chem.*, **269**, 20807- 20810.
- Bar-Sagi, D. & Hall, A. (2000) Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* **103**, 227-238.
- Baumeister, M. A., Martinu, L., Rossman, K. L., Sondek, J., Lemmon, M. A. and Chou, M. M. (2003) Loss of phosphatidylinositol 3- phosphate binding by the C- terminal Tiam1 pleckstrin homology domain prevents *in vivo* Rac1 activation without affecting membrane targeting. *J.*

- Biol. Chem.* **278**, 11457- 11464.
- Baeuerle, P. A., and T. Henkel. 1994. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 141–179.
- Belanis, L., Plowman, S. J., Rotblat, B., Hancock, J. F., Kloog, Y. (2008) Galectin-1 is a novel structural component and a major regulator of H-Ras nanoclusters. *Mol Biol Cell.*, **19**(4), 1404-14.
- Bour, G., Plassat, J.L., Bauer, A., Lalevee, S., Rochette-Egly, C. (2005) Vinexin beta interacts with the non-phosphorylated AF-1 domain of retinoid receptor gamma (RARgamma) and represses RARgamma-mediated transcription. *J Biol Chem.*, **280**, 17027-37.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem*, **72**, 248- 254.
- Braga VM, Del Maschio A, Machesky L, Dejana E. (1999) Regulation of the cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell*, **10**, 9-22.
- Brummelkamp T. R., Bernards R. and Agami R. (2002) A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* **296**, 550-553.
- Breslauer, K.J., Frank, R., Blöcker, H. and Marky, L. A. (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 3746-3750.
- Buchanan, F. G., Elliot, C. M., Gibbs, M. and Exton, J. H. (2000) Translocation of the Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 induced by platelet- derived growth factor and lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **275**, 9742- 9748.
- Buchsbaum, R. J., Connolly, B. A. and Feig, L. A. (2002) Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and ras- GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4073- 4085.
- Buchsbaum, R. J., Connolly, B. A. and Feig, L. A. (2003) Regulation of p70 S6 Kinase by complex formation between the Rac GEF Tiam1 and the scaffold Spinophilin. *J. Biol. Chem.*, **278**, 18833-18841.
- Buday L. (1999) Membrane-targeting of signaling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1422**, 187-204.
- Buongiorno, P., Pethe, V. V., Charames, G. S., Esufali, S., Bapat, B. (2008) Rac1 GTPase and the Rac exchange factor Tiam1 associate with Wnt-responsive promoters to enhance beta-catenin/TCF-dependent transcription in colorectal cancer. *Mol Cancer*, **7**, 73.
- Camby, I., Decaestecker, C., Lefranc, F., Kaltner, H., Gabius, H. J. and Kiss, R. (2005) Galectin-1 knocking down in human U87 glioblastoma cells alters their gene expression pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **335**, 27-35.
- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., Kiss, R., (2006) Galectin-1: A Small Protein with Major Functions. *Glycobiology*, **16**, 137R-157R.
- Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y.W., Zeckner, D.J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M.H., Blanchard, K.L., Thomas, J.E. (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature.* , **448**(7152), 439-44.
- Carragher, N.O., Westhoff, M.A. , Riley, D., Potter, D.A. , Dutt, P., Elce, J.S. , Greer, P.A., and Frame, M.C. (2002) v-Src-induced modulation of the calpain/calpastatin proteolytic system regulates transformation. *Mol. Cell Biol.* **22**, 257–269.
- Chadli, A., LeCaer, J. P., Bladier, D., Joubert-Caron, R. and Caron, M. (1997) Purification and characterization of a human brain Galectin-1 ligand. *J. Neurochem.*, **68**, 1640-1647.

- Chen, H. and Antonarakis S. E. (1995) Localisation of a human homolog of the mouse Tiam1 Gene to chromosome 21q22.1. *Genomics* **30**, 123- 127.
- Cheng, G., Diebold, B. A., Hughes, Y. and Lambeth, J. D. (2006). Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J. Biol. Chem.* **281**, 17718-17726.
- Cho, M. and Cummings, R. D. (1995) Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5198-5206.
- Cindolo, L., Benvenuto, G., Salvatore, P., Pero, R., Salvatore, G., Mirone, V., Prezioso, D., Altieri, V., Bruni, C.B., Chiariotti, L. (1999) Galectin-1 and Galectin-3 expression in human bladder transitional-cell carcinomas. *Int J Cancer.* ; **84**(1), 39-43.
- Cimmino, F., Schulte, J.H., Zollo, M., Koster, J., Versteeg, R., Iolascon, A., Eggert, A., Schramm, A. (2009) Galectin-1 is a major effector of TrkB-mediated neuroblastoma aggressiveness. *Oncogene.* ; **28**(19), 2015-23.
- Clausse, N., van den Brule, F., Waltregny, D., Garnier, F. and Castronovo, V. (1999) Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. *Angiogenesis*, **3**, 317-325.
- Clerch, L. B., Whitney, P., Hass, M., Brew, K., Miller, T., Werner, R. and Massaro, D. (1988) Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry*, **27**, 692-629.
- Compton, S. J. and Jones, C. G. (1985) Mechanisms of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, **151**, 369-374.
- Cooper, D. N. and Barondes, S. H. (1999) God must love galectins; He made so many of them. *Glycobiology*, **9**, 979-984.
- Correll P. H., Colilla S. und Karlsson S. (1994): Retroviral vector design for long-term expression in murine hematopoietic cells *in vivo*. *Blood* **84** (6): 1812-1822.
- Crompton, A. M., Foley, L. H., Wood, A., Roscoe, W., Stokoe, D., McCormick, F., Symons, M. and Bollag, G. (2000) Regulation of Tiam1 Nucleotide Exchange Activity by Pleckstrin Domain Binding Ligands. *J. Biol. Chem.* **275**, 25751- 25759.
- Cummings R.D., Liu F.T. In: Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Etzler M.E., editors. (2009) Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 33.
- Danguy, A., Camby, I. and Kiss, R. (2002) Galectins and cancer. *Biochem. Biophys. Acta*, **1572**, 285-293.
- Decaestecker, C., Debeir, O., Van Ham, P. and Kiss, R. (2006) Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration (Review). *Med. Res. Rev.*, **27**(2), 149-76.
- Dias-Baruffi, M., Zhu, H., Cho, M., Karmakar, S., McEver, R. P. and Cummings, R. D. (2003) Dimeric Galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **278**, 41282-41293.
- Drickamer, K. (1988) Two distinct classes of phospholipid recognition domains in animal lectins. *Journ Biol Chem*, **263**, 9557-9560.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002, **82**, 47-95.
- Dykxhoorn D. M., Novina C. D. & Sharp P. A. (2003): Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 457-467.
- Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I. and Moolenaar, W. H. (1993) The bioactive phospholipids lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem. J.* **291**, 677- 680.

- Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Ballan, E., Gabius, H. J. and Kloog, Y. (2002) Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 37169-37175.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. & Tuschl T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture. *Nature* **411**, 494-498.
- Elbashir S. M., Lendeckel W. & Tuschl T. (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188-200.
- Engers, R. and Gabbert, H. E. (2000) Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol*, **126**, 682- 692.
- Engers, R., Mueller, M., Collard, J. G., Willers, R., and Gabbert, H. E. (2006) Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinomas. *British J. Cancer* **95**, 1081- 1086.
- Engers, R., Springer E., Michiels, F., Collard, J. G. and Gabbert, H. E. (2001) Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up- regulating tissue inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)- 1 and TIMP- 2 expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 41889-41897.
- Engers, R., Springer, E., Kehren, V., Simic, T., Young, D. A., Beier, J., Klotz, L. O., Clark, I. M., Sies, H., Gabbert, H. E. (2006) Rac up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 expression by redox-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) Character. *FEBS J*, **273**, 4754- 4769.
- Engers, R., Zwaka, T. P., Gohr, L., Weber, A., Gerharz, C. D., Gabbert, H. E. (2000) Tiam1 mutations in human renal-cell carcinomas. *Int J Cancer*, **88**, 369- 376.
- Esposito F., Ammendola R., Faraonio R., Russo T., Cimino F. (2004) Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence. *Neurochem. Res.*, **29**, 617-628.
- Fattman C. L., Schaefer L. M., Oury T. D. (2003) Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.* , **35**, 236-256.
- Fischer, C., Sanchez-Ruderisch, H., Welzel, M., Wiedenmann, B., Sakai, T., Andre, S., Gabius, H. J., Khachigian, L., Detjen, K. M. and Rosewicz, S. (2005) Galectin-1 Interacts with the $\alpha 5 \beta 1$ Fibronectin Receptor to Restrict Carcinoma Cell Growth via Induction of p21 and p27. *J. Biol. Chem.*, **280**, 37266-37277.
- Fleming, I. N., Elliot, C. M. and Exton, J. H. (1998) Phospholipase C- γ , protein kinase C and Ca^{2+} / calmodulin- dependent protein kinase II are involved in platelet- derived growth factor- induced phosphorylation of Tiam1. *FEBS Letters* **429**, 229- 233.
- Fleming, I. N., Elliot, C. M., Collard, J. G. and Exton, J. H. (1997) Lysophosphatidic acid induces threonine phosphorylation of Tiam1 in swiss 3T3 fibroblasts via activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **272**, 33103- 33110.
- Fleming, I. N., Gray, A. and Downes, C. P. (2000) Regulation of the Rac1- specific exchange factor Tiam1 involves both phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent components. *Biochem. J.* **351**, 173- 182.
- Frank, O. (2000): Abschaltungsmechanismen retroviraler Gensequenzen: Konstruktion verbesserter Vektoren für die somatische Gentherapie beim Menschen. *Dissertation*, Hamburg.
- Frazier, W. A., Rosen, S. D., Reitherman, R. W. and Barondes, S. H. (1975) Purification and comparison of two developmentally regulated lectins from Dictostelium discoidium. Discoidin I and II. *J Biol. Chem.*, **250**, 7714-7721.
- Fuertes, M.B., Molinero, L.L., Toscano, M.A., Ilarregui, J.M., Rubinstein, N., Fainboim, L., Zwirner, N.W., Rabinovich, G.A. (2004) Regulated expression of 170inculin-1 during T-cell activation involves Lck and Fyn kinases and 170inculin170170 through MEK1/ERK, p38 MAP kinase and

- p70S6 kinase. *Mol Cell Biochem.* , **267**(1-2), 177-85.
- Fukai T., Folz R. J., Landmesser U., Harrison D. G. (2002) Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.*, **55**, 239-249.
- Fulcher, J.A., Chang, M.H., Wang, S., Almazan, T., Hashimi, S.T., Eriksson, A.U., Wen, X., Pang, M., Baum, L.G., Singh, R.R., Lee, B. (2009) Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through Syk and protein kinase C signaling. *J Biol Chem.*; **284**(39), 26860-70.
- Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E. and Schiff, C. (2002) Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 13014-13019.
- Gauthier, S., Pelletier, I., Ouellet, M., Vargas, A., Tremblay, M. J., Sato, S., Barbeau, B. (2008) Induction of galectin-1 expression by HTLV-I Tax and its impact on HTLV-I infectivity. *Retrovirology*, **5**:105
- Gerharz, C. D., Gabbert, H. E., Mellin, W., Engers, R. and Gabbiani, G. (1988) The intraclonal and interclonal phenotypic characterization in a rhabdomyosarcoma cell line with abortive initiation of embryonic myogenesis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **55**, 193-206.
- Gillenwater, A., Xu, X.C., el-Naggar, A.K., Clayman, G.L., Lotan, R. (1996) Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* ; **18**, 422–32.
- Glinsky, V.V., Huflejt, M.E., Glinsky, G.V., Deutscher, S.L., and Quinn, T.P. (2000) Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells. *Cancer Res.*, **60**, 2584–2588.
- Goldberg, G.I., Strongin, A., Collier, I.E., Genrich, L.T. and Marmer, B.L. (1992) Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization , complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J.Biol.Chem.* **267**, 4583-4591.
- Gonzalez, E., Kou, R., Michel, T. (2006) Rac1 modulates sphingosine 1-phosphate-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* ,**281**(6), 3210-6.
- Gomez del Pulgar, T., Bandres, E., Espina, C., Valdes-Mora, F., Perez-Palacios, R., Garcia-Amigot, F., Garcia-Foncillas, J., Lacal, J. C. (2007) Differential expression of Rac1 identifies its target genes and its contribution to progression of colorectal cancer. . *J. Biol. Chem.*, **39**, 2289-302.
- Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q. and Holbrook, N. J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J. Biol. Chem.* **271**, 4138-4142
- Habets, G. G. M., Scholtes, E. H. M., Zuydgeest, D., van der Kammen, R. A., Stam, J. C., Berns, A. and Collard, J. G. (1994) Identification of an invasion inducing gene, Tiam1, that encodes a protein with homology to GDP- GTP exchangers for Rholike Proteins. *Cell* **77**, 537- 549.
- Halliwell B. und Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 231-255.
- Hammond, G., Thomas, C. L. and Schiavo, G. (2004) Nuclear phosphoinositides and their functions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **282**, 177- 206.
- Hanahan, D. (1983): *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* *J. Mol. Biol.*, **166**, 4, 557-580
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.

- Harvey, S., Zhang, Y., Landry, F., Miller, C. and Smith, J. W. (2001) Insights into a plasma membrane signature. *Physiol. Genomics*, **5**, 129-136.
- Hefner Y., Borsch-Haubold A. G., Murakami M., Wilde J. I., Pasquet S., Schieltz D., Ghomashchi F., Yates J. R., III, Armstrong C. G., Paterson A., et al. (2000) Ser727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A₂ by MNK1-related protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **275**, 37542–37551.
- Henis, Y. I., Hancock, J. F., Prior, I. A. (2009) Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters. (Review) *Mol Membr Biol.*, **26**(1), 80-92.
- Henning, W. (2002) Genetik. 3. Auflage. Springer- Verlag Berlin Heidelberg.
- Hempel S. L., Buettner G. R., O'Malley Y. Q., Wessels D. A., Flaherty D. M. (1999) Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)- carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 146-159.
- Hernandez, J. D. and Baum, L. G. (2002) Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology*, **12**, 127R-136R.
- Hevessy, Z., Nagy Jr, B., Kiss, F., Kiss, A. and Kappelmayer, J. (2005) Mean fluorescence intensity rate is a useful marker in the detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones. *Clin Chem Lab Med*, **43**, 919-923.
- Hirabayashi, J., Ayaki, H., Soma, G. and Kasai, K. (1989) Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human 14 kDa beta-galactoside-binding lectin. *Biochem. Biophys. Acta* **1008**, 85-91.
- Hittelet, A., Legendre, H., Nagy, N., Bronckart, Y., Pector, J. C., Salmon, I., Yeaton, P., Gabius, H. J., Kiss, R. and Camby, I. (2003) Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. *Int. J. Cancer*, **103**, 370-379.
- Hoffman, G. R. and Cerione R. A. (2002) Signalling to the Rho GTPases; networking with the DH domain. *FEBS Letters* **513**, 85- 91.
- Hoffmann, M.J., Engers, R. (2008) TIAM1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.
- Hong-Geller E., Holowka D., Siraganian R. P., Baird B., Cerione R. A. (2001) Activated Cdc42/Rac reconstitutes Fcepsilon RI-mediated Ca²⁺ mobilization and degranulation in mutant RBL mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* ; **98**, 1154–1159.
- Hordijk, P. L., ten Klooster, J. P., van der Kamen, R. A., Michiels, F., Oomen, L. C. J. M. and Collard, J. G. (1997) Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1- Rac signalling. *Science* **278**, 1464-1466.
- Horiguchi, N., Arimoto, K., Mizutani, A., Endo-Ichikawa, Y., Nakada, H. and Taketani, S. (2003) Galectin-1 induces cell adhesion to the extracellular matrix and apoptosis of non-adherent human colon cancer Colo201 cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, **134**, 869-874.
- Hughes, R. C. (1999) Secretion of the Galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 172-185.
- Hsieh, S.H., Ying, N.W., Wu, M.H., Chiang, W.F., Hsu, C.L., Wong, T.Y., Jin, Y.T., Hong, T.M., Chen, Y.L. (2008) Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene*. **27**(26):3746-53.
- Inagaki, Y., Sohma, Y., Horie, H., Nozawa, R. and Kadoya, T. (2000) Oxidized Galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2955-2964.
- Innocenti, M., Tenca, P., Frittoli, E., Faretta, M., Tochetti, A., Di Fiore, P.P. and Scita, G. (2002)

- Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac. *JBC*, **156**, 125-136.
- Ito, H., Usuda, N., Atsuzawa, K., Iwamoto, I., Sudo, K., Katoh-Semba, R., Mizutani, K., Morishita, R., Deguchi, T., Nozawa, Y., Asano, T., Nagata, K. (2007) Phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase of a multidomain adaptor protein, Vinexin- β , at synapses. *J Neurochem.*, **100**, 545-54.
- Itzkowitz SH. (1997) Galectins: multipurpose carbohydrate-binding proteins implicated in tumor biology. *Gastroenterology*, **113**, 2003-5.
- Jordan, M., Schallhorn, A., und Wurm, F. M. (1996): Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* **24**, 596-601.
- Jung, E.J., Moon, H.G., Cho, B.I., Jeong, C.Y., Joo, Y.T., Lee, Y.J., Hong, S.C., Choi, S.K., Ha, W.S., Lee, C.W., Lee, J.S., Park, S.T. (2007) Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer.* ; **120**(11), 2331-8.
- Jung, T.Y., Jung, S., Ryu, H.H., Jeong, Y.I., Jin, Y.H., Jin, S.G., Kim, I.Y., Kang, S.S., Kim, H.S. (2008) Role of Galectin1 in migration and invasion of human glioblastoma multiforme cell lines. *J Neurosurg.* ; **109**(2), 273-84.
- Karnoub, A. E., Weinberg, R. A. (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **9**(7), 517-31.
- Keely, P.J., Westwick, J.K., Whitehead, I.P., Der, C.J., Parise, L.V. (1997) Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature*, **390**, 632-6.
- Kioka N, Sakata S, Kawauchi T, Amachi T, Akiyama SK, Okazaki K, Yaen C, Yamada KM, Aota S. (1999) Vinexin: a novel Vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J Cell Biol.* , **144**, 59-69.
- Kioka, N., Ueda, K., Amachi, T. (2002) Vinexin, CAP/ponsin, ArgBP2: a novel adaptor protein family regulating cytoskeletal organization and signal transduction. *Cell Struct Funct.*, **27**, 1-7.
- Kim, B.C. and Kim, J.H. (1997) Nuclear signaling by Rac GTPase: essential role of phospholipase A₂. *Biochem J.*, **326**, 333-337.
- Kimura, A., Baumann, C.A., Chiang, S.H., Saltiel, A.R. (2001) The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98**, 9098-103.
- Koh, H.S., Lee, C., Lee, K.S., Ham, C.S., Seong, R.H., Kim, S.S., Jeon, S.H. (2008) CD7 expression and Galectin-1-induced apoptosis of immature thymocytes are directly regulated by NF-kappaB upon T-cell activation. *Biochem Biophys Res Commun.* , **370**(1):149-53.
- Koh, H.S., Lee, C., Lee, K.S., Park, E. J., Seong, R.H., Hong, S., Jeon, S.H. (2009) Twist2 regulates CD7 expression and Galectin-1-induced apoptosis in mature T-cells. *Mol Cells.*, **28**(6), 553-8.
- Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Andre, S., Kaltner, H., Uhl, J., Ehemann, V., Cantz, M. and Gabius, H. J. (2001) Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of Galectin-1 and functional divergence from Galectin-3. *J Biol Chem*, **276**, 35917-35923.
- Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Burchert, M., Cantz, M. and Gabius, H. J. (1998) Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture. *J. Biol. Chem.*, **273**, 11205-11211.
- Koziczak, M., and Hynes, N.E. (2004) Cooperation between fibroblast growth factor receptor-4 and

- ErbB2 in regulation of cyclin D1 translation. *J Biol Chem.*, **279**(48), 50004-11.
- Kuroda, S., Fukata, M., Fujii, K., Nakamura, T., Izawa, I., Kaibuchi, K. (1997) Regulation of cell-cell adhesion of MDCK cells by Cdc42 and Rac1 small GTPases. *Biochem Biophys Res Commun*; **240**, 430-5.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lambert, J. M., Lambert, Q. T., Reuther, G. W., Malliri, A., Siderovski, D. P., Sondek, J., Collard, J. G. and Channing C. J. (2002) Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K- independent mechanism. *N. Cell. Biol.* **4**, 621- 625.
- Lee, S.H., Kunz, J., Lin, S.H., Yu-Lee, L.Y. (2007) 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res.*, **67**(22), 11045-53.
- Lee, M.Y., Lee, S.H., Park, J.H. and Han, H.J. (2009) Interaction of Galectin-1 with caveolae induces mouse embryonic stem cell proliferation through the Scr, Eras, Akt and mTOR signaling pathways. *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**(8), 1467-78.
- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. and Poirier, F. (2004) Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journ.*, **19**, 433-440.
- Leng, J., Klemke, R. L., Reddy, A. C., and Cheresch D. A. (1999) Potentiation of Cell Migration by Adhesion-dependent Cooperative Signals from the GTPase Rac and Raf Kinase. *JBC*, **274**, 37855-61.
- Li, T., Paudel, H. K. (2006) Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry*, **45**(10), 3125-33.
- Lim B., Apperley J. F., Orkin S. H. und Williams D. A. (1989): Long-term expression of human adenosine deaminase in mice transplanted with retrovirus-infected hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (22): 8892-8896.
- Liu, F. T. and Rabinovich, G. A. (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 29-41.
- Liu, S.D., Whiting, C.C., Tomassian, T., Pang, M., Bissel, S.J., Baum, L.G., Mossine, V.V., Poirier, F., Huflejt, M.E., Miceli, M.C. (2008) Endogenous Galectin-1 enforces class I-restricted TCR functional fate decisions in thymocytes. *Blood*. **112**(1):120-30.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipurski, S. L., Matsudaira, P. and Darnell, J. (2000) Molecular Cell Biology. 3rd Edition, Scientific American Books, Inc.
- Lopez-Lucendo, M. F., Solis, D., Andre, S., Hirabayashi, J., Kasai, K., Kaltner, H., Gabius, H. J. and Romero, A. (2004) Growth-regulatory human Galectin-1: crystallographic Characterization of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. *J. Mol. Biol.*, **343**, 957-970.
- Lüscher, B. and Nordheim, A. (2006) Onkogene und Protoonkogene. *Kompendium Internistische Onkologie*, **1**, 21-28.
- Malliri, A. and Collard, J. G. (2003) Role for Rho- family proteins in cell adhesion and cancer. *Curr. Cell Biol.* **15**, 583- 589.
- Malliri, A., Rygiel, T. P., van der Kammen, R. A., Song, J. Y., Engers, R., Hurlstone, A. F., Clevers, H., Collard, J. G. (2006) The rac activator Tiam1 is a Wnt-responsive gen that modifies intestinal tumor development. *J Biol Chem.*, **281**(1), 543-8.
- Malliri, A., Ten Klooster, J. P., Olivo, C. and Collard, J. G. (2008) Determination of the Activity of Rho-Like GTPases in Cells. *Methods in Molecular Biology, GTPase Protocols II (Humana Press)*; 99-109.

- Martelli, A.M., Cocco, L., Capitani, S., Miscia, S., Papa, S., Manzoli, F.A. (2007) Nuclear phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and Pten: emerging key regulators of anti-apoptotic signaling and carcinogenesis. *Eur J Histochem.*, **51** Suppl 1, 125-31.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., and Tuschel, T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563-574.
- Masamune, A., Satoh, M., Hirabayashi, J., Kasai, K., Satoh, K., Shimosegawa, T. (2006) Galectin-1 induces chemokine production and proliferation in pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **290**(4):G729-36.
- Matsuyama, M., Mizusaki, H., Shimono, A., Mukai, T., Okumura, K., Abe, K., Shimada, K., Morohashi, K. (2005) A novel Isoform of Vinexin, Vinexin gamma, regulates Sox9 gene expression through activation of MAPK cascade in mouse fetal gonad. *Genes Cells*, **10**, 421-34.
- McIntyre, G. and Fanning, G.C. (2006) Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. *BMC Biotech* **6**:1.
- Mertens, A. E., Roovers, R. C. and Collard, J. G. (2003) Regulation of Tiam1-Rac signaling. *FEBS Letters* **546**, 11- 16.
- Michiels, F., Habets, G. G., Stam, J. C., van der Kammen, R. A. and Collard, J. G. (1995) A role for rac in Tiam1- induced membrane ruffling and invasion. *Nature*, **375**, 338- 340.
- Michiels, F., Stam, J. C., Hordijk, P. L., van der Kammen, R. A., Ruuls-van Stalle, L., Feltkamp, C. A. and Collard, J. G. (1997) Regulated Membrane Localisation 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.* **137**, 387- 398.
- Minard, M. E., Kim, L., Price, J. E. and Gallick, G. E. (2004) The role of the guanine exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression. *Breast Cancer Research and Treatment* **84**, 21-32.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A., and Karin, M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42. *Cell.*; **81**(7), 1147-57.
- Mitsushima M, Suwa A, Amachi T, Ueda K, Kioka N. (2004) Extracellular signal-regulated kinase activated by epidermal growth factor & cell adhesion interacts with and phosphorylates Vinexin. *J Biol Chem*, **279**, 34570-7.
- Mitsushima, M., Sezaki, T., Akahane, R., Ueda, K., Suetsugu, S., Takenawa, T. (2006 a) Protein kinase A-dependent increase in WAVE2 expression induced by the focal adhesion protein vinexin. *Genes Cells*, **11**(3),281-92.
- Mitsushima, M., Takahashi, H., Shishido, T., Ueda, K., Kioka, N. (2006 b) Abl kinase interacts with and phosphorylates vinexin. *FEBS Lett.*, **580**(17), 4288-95.
- Mitsushima, M., Ueda, K., Kioka, N. (2006 c) Vinexin beta regulates the phosphorylation of epidermal growth factor receptor on the cell surface. *Genes Cells.*, **11**(9), 971-82.
- Mitsushima, M., Ueda, K., Kioka, N. (2007) Involvement of phosphatases in the anchorage dependent regulation of ERK2 activation. *Exp Cell Res.*; **313**(9), 1830-8.
- Miyano, K., Koga, H., Minakami, R., Sumimoto, H., (2009) The insert region of the Rac GTPases is dispensable for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Biochem. J.*; **422**, 373–82.
- Mizutani, K., Ito, H., Iwamoto, I., Morishita, R., Deguchi, T., Nozawa, Y., Asano, T., Nagata, K. I. (2007) Essential roles of ERK-mediated phosphorylation of Vinexin in cell-spreading, migration and anchorage-independent growth. *Oncogene*, **26**(50), 7122-31.

- Moiseeva EP, Spring EL, Baron JH, de Bono DP. (1999) Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. *J Vasc Res*, **36**, 47-58.
- Moiseeva, E.P., Javed, Q., Spring, E.L., and de Bono, D.P. (2000) Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc.Res.*, **45**, 493–502.
- Montaner, S., Perona, R., Saniger, L., and Lacal, J.C. (1998) Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J Biol Chem.*, **273**, 12779-85.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.1986 [classical article]. *Biotechnology*, **24**, 17-27.
- Müller, T., Bain, G., Wang, X. and Papkoff, J. (2002) Regulation of epithelial cell migration and tumor formation by beta-catenin signaling. *Exp Cell Res*. **280**(1), 119-33.
- Miyano, K., Ueno, N., Takeya, R. and Sumimoto, H. (2006). Direct Involvement of the Small GTPase Rac in Activation of the Superoxide-producing NADPH Oxidase Nox1. *J. Biol. Chem.* **281**, 21857-21868.
- Nagata, K., Ito, H., Iwamoto, I., Morishita, R., and Asano, T. (2009) Interaction of a multi-domain adaptor protein, Vinexin, with a Rho-effector, Rhotekin. *Med Mol Morphol*, **42**, 9–15.
- Nickel, W. (2005) Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic*, **6**, 607-614.
- Nimnual A.S., Yatsula B.A. and Bar-Sagi D. (1998) Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science*, **279**, 560-3.
- Nimnual, A.S. and Bar-Sagi, D. (2002) The two Hats of SOS. *Sci. STKE* 2002, **145**, pe36.
- Olson, M. F., Ashworth, A. & Hall, A. (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**, 1270-1272.
- Otsuki, Y., Tanaka, M., Kamo, T., Kitanaka, C., Kuchino, Y. and Sugimura, H. (2002) Guanine nucleotide exchange factor, Tiam1, directly binds to c- Myc and interferes with c- Myc-mediated Apoptosis in Rat- 1 fibroblasts. *J. Brit. Cancer* **278**, 5132-5140.
- Otsuki, Y., Tanaka, M., Yoshii, S., Kawazoe, N., Nakaya, K. and Sugimura, H. (2001) Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *PNAS* **98**, 4385- 4390.
- Pace, K. E., Lee, C., Stewart, P. L. and Baum, L. G. (1999) Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by Galectin-1. *J. Immunol.*, **163**, 3801-3811.
- Park, J. W., Voss, P. G., Grabski, S., Wang, J. L. and Patterson, R. J. (2001) Association of Galectin-1 and Galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3595-3602.
- Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E. and Kloog, Y. (2001) Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*, **20**, 7486-7493.
- Pei, Y. & Tuschl, T. (2006): On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat. Methods* **3**, 670-676.
- Penuel, E., Martin, G. S., (1999) Transformation by v-Src: Ras-MAPK and PI3KmTOR mediate parallel pathways. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1693–1703.
- Peppelenbosch M. P., Qiu R. G., de Vries-Smits A. M., Tertoolen L. G., de Laat S. W., McCormick F., Hall A., Symons M. H., Bos J. L. (1995) Rac mediates growth factor-induced arachidonic acid release. *Cell.* ; **81**, 849–856.

- Perillo, N. L., Marcus, M. E. and Baum, L. G. (1998) Galectins: versatile modulators of cell, adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med*, **76**, 402-412.
- Perillo, N. L., Uittenbogaart, C. H., Nguyen, J. T. and Baum, L. G. (1997) Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J. Exp. Med.*, **185**, 1851-1858.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sánchez-Pérez, I., Bravo, R., and Lacal, J.C. (1997) Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* **11**(4), 463-75.
- Pingoud, A. and Urbanke, C. (1997) Elektrophorese. Arbeitsmethoden der Biochemie. (ed. By A. Pingoud & C. Urbanke), pp. 101-131. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Ponting, C.P. (1999) Raf-like Ras/Rap-binding domains in RGS12- and still-life-like signalling proteins. *J Mol Med.*; **77**(10), 695-8.
- Prior, I. A., Muncke, C., Parton, R. G., Hancock, J. F. (2003) Direct visualization of ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol.*, **160**(2), 165-70.
- Qiu, R. G., Chen, J., McCormick, F. and Symons, M. (1995) A role for Rho in Ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11781- 11785.
- Quilliam, L.A. (2007) New insights into the Mechanisms of SOS Activation. *Sci. STKE* **2007**, pe67.
- Rabinovich, G. A. (2005) Galectin-1 as a potential cancer target. *Br. J. Cancer*, **92**, 1188-1192.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J. and Davis, R. J. (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogenactivated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, **270**, 7420-7426.
- Rorive, S., Belot, N., Decaestecker, C., Lefranc, F., Gordower, L., Micik, S., Maurage, C.A., Kaltner, H., Ruchoux, M.M., Danguy, A., Gabius, H.J., Salmon, I., Kiss, R., Camby, I. (2001) Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. *Glia*. ; **33**(3), 241-55.
- Rotblat, B., Niv, H., Andre, S., Kaltner, H., Gabius, H. J. and Kloog, Y. (2004) Galectin- 1(L11A) predicted from a computed Galectin-1 farnesyl-binding pocket selectively inhibits Ras-GTP. *Cancer Res.*, **64**, 3112-3118.
- Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N. W., Toscano, M. A., Ilarregui, J. M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O. L. and Rabinovich, G. A. (2004a) Targeted inhibition of Galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T-Cell mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*, **5**, 241-251.
- Rufer, A.C., Rumpf, J., von Holleben, M., Beer, S., Rittinger, K. and Groemping, Y. (2009) Isoform-selective Interaction of the Adaptor Protein bTks5/FISH with Sos1 and Dynamins. *J. Mol. Biol.*, **390**, 939-950.
- Rychlik, W., Spencer, W. J. and Rhoads, R.E. (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl Acid Res*, **18**, 6409-6412.
- Rygiel, T.P., Mertens, A.E., Strumane, K., van der Kammen, R., Collard, J.G. (2008) The Rac activator Tiam1 prevents keratinocyte apoptosis by controlling ROS-mediated ERK phosphorylation. *J Cell Sci.* **121**(Pt 8), 1183-92.
- Saiki, K. R., Faloona, F., Mullis, K., Horn. C., Erlich, H. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta- globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Salvatore P, Benvenuto G, Caporaso M, Bruni CB, Chiariotti L(1998) High resolution methylation analysis of the galectin-1 gene promoter region in expressing and nonexpressing tissues. *FEBS Lett*, **421**:152-158

- Salvatore P, Benvenuto G, Pero R, Lembo F, Bruni CB, Chiariotti L. (2000) Galectin-1 gene expression and methylation state in human T leukemia cell lines. *Int J Oncol* , **17**:1015-1018
- Sander, E. E., v. Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F. and Collard, J. G. (1998) Matrix-dependent Tiam1/Rac Signalling in Epithelial Cells Promotes Either Cell-Cell Adhesion or Cell Migration and Is Regulated by Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Journal of Cell Biology* **143**, 1385-1398.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.
- Sanjuán, X., Fernández, P.L., Castells, A., Castronovo, V., van den Brule, F., Liu, F.T., Cardesa, A., Campo, E. (1997) Differential expression of Galectin3 and Galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology*; **113**(6), 1906-15.
- Schmidt, A. and Hall, A. (2006) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases turning on the switch. *Genes & Development* **16**, 1587- 1609.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* **115**, 199-208.
- Seelenmeyer, C., Wegehinkel, S., Lechner, J. and Nickel, W. (2003) The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for Galectin-1. *J. Cell Sci.*, **116**, 1305-1318.
- Seelenmeyer, C., Wegehinkel, S., Tews, I., Künzler, M., Aebi, M. and Nickel, W. (2009) Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of Galectin-1. *Journal of Cell Biology*, **171**, 373-381.
- Sethi, G., Sung, B., and Aggarwal, B.B. (2008) Nuclear factor κB-activation: From bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)*. **233**(1), 21-31. Review.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. and Maizel Jr, J. V. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS- polyacrylamid gels. *Biochem Biophys Res Com*, **28**, 815-820.
- Shaw, L.M., Rabinovitz, I., Wang, H.H., Toker, A., Mercurio, A.M. (1997) Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the α6β4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell*, **91**, 949-60.
- Sheikh, S. N. and Lazarus, P. (1997) Re- usable DNA template for the polymerase chain reaction (PCR). *Nucl Acid Res*, **25**, 3537-3542.
- Sheng M, Sala C. (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci*; **24**:1-29.
- Singh, A., Karnoub, A.E., Palmby, T.R., Lengyel, E., Sondek, J., Der, C.J. (2004) Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. *Oncogene*; **23**(58), 9369-80.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92** (6), 735–45.
- Spano, D., Russo, R., Di Maso, V., Rosso, N., Terracciano, L.M., Roncalli, M., Tornillo, L., Capasso, M., Tiribelli, C., Iolascon, A. (2010) Galectin-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma aggressiveness. *Mol Med*; **16**(3-4), 102-15.
- Stam, J. C., Sander, E. E., Michiels, F., van Leeuwen, F. N., Kain, H. E. T., van der Kammen, R. and Collard J. G. (1997) Targeting of Tiam1 to the Plasma Membrane Requires the cooperative Function of the N- terminal Pleckstrin Homology Domain and an Adjacent Protein Interaction Domain. *J. Biol. Chem.* **272**, 28447- 28454.
- Stehelin, D., Fujita, D.J., Padgett, T., Varmus, H.E., Bishop, J.M. (1977). Detection and enumeration of transformation-defective strains of avian sarcoma virus with molecular hybridization.

- Virology*, **76** (2): 675–84.
- Strumane, K., Rygiel, T. P., Collard, J. G. (2006) The Rac activator Tiam1 and Ras-induced oncogenesis. *Methods Enzymol.*, **407**, 269-81.
- Strumane, K., Song, J.Y., Baas, I., Collard, J.G. (2008) Increased Rac activity is required for the progression of T-lymphomas induced by Pten-deficiency. *Leuk Res.*, **32**(1), 113-20.
- Suwa, A., Mitsushima, M., Ito, T., Akamatsu, M., Ueda, K., Amachi, T., Kioka, N. (2002) Vinexin beta regulates the anchorage dependence of ERK2 activation stimulated by epidermal growth factor. *J Biol Chem.*, **277**, 13053-8.
- Symons, M. (1995) The Rac and Rho pathways as a source of drug targets for Ras-mediated malignancies. *Curr Biol* 1995, **6**, 668-674.
- Takahashi, H., Mitsushima, M., Okada, N., Ito, T., Aizawa, S., Akahane, R., Umemoto, T., Ueda, K., Kioka, N. (2005) Role of interaction with vinculin in recruitment of vinexins to focal adhesions. *Biochem Biophys Res Commun.*, **336**, 239-46.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., Takai, Y. (1997) Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol*, **139**, 1047-59.
- Takenawa, T., Miki, H. (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci.*, **114**, 1801-9.
- ten Klooster JP, Evers EE, Janssen L, Machesky LM, Michiels F, Hordijk P, Collard JG. (2006) Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actinpolymerization. *Biochem J*; **397**, 39-45.
- Terawaki, S., Kitano, K., Mori, T., Zhai, Y., Higuchi, Y., Itoh, N., Watanabe, T., Kaibuchi, K., Hakoshima, T. (2009) The PHCCE domain of Tiam1/2 is a novel protein- and membrane-binding module. *EMBO Open. The EMBO Journal* **29**, 236 – 250.
- Thomas S., Kumar R.S. and Brumeanu.T.D (2004). Role of lipid rafts in T cells. *AITE* **52**: 215-224
- Tybulewicz V. L., Crawford C. E., Jackson P. K., Bronson R. T. und Mulligan R. C. (1991): Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the *cabl* proto-oncogene. *Cell* **65** (7): 1153-1163.
- Umemoto, T., Tanaka, K., Ueda, K., Kioka, N. (2009) Tyrosine phosphorylation of Vinexin in v-Scr-transformed cells attenuates the affinity for Vinculin. *Biochem Biophys Res Commun.*, **387**(1), 191-5.
- Valenzuela, H. F., Pace, K. E., Cabrera, P. V., White, R., Porvari, K., Kaija, H., Vihko, P. and Baum, L. G. (2007) O-Glycosylation Regulates LNCaP Prostate Cancer Cell Susceptibility to Apoptosis Induced by Galectin-1. *Cancer Res* ; **67**(13), 6155–62.
- Van den Brûle, F.A., Buicu, C., Berchuck, A., Bast, R.C., Deprez, M., Liu, F.T., Cooper, D.N., Pieters, C., Sobel, M.E., Castronovo, V. (1996) Expression of the 67-kD laminin receptor, Galectin-1, and Galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. *Hum Pathol.* ;**27**(11), 1185-91.
- Van den Brûle, F., Califice, S. and Castronovo, V. (2004) Expression of galectins in cancer: A critical review. *Glycoconjugate Journ.*, **19**, 537-542.
- Van den Brûle, F., Califice, S., Garnier, F., Fernandez, P. L., Berchuck, A. and Castronovo, V. (2003) Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. *Lab. Invest.*, **83**, 377-386.
- Van den Brule FA, Buicu C, Baldet M, Sobel ME, Cooper DN, Marschal P, Castronovo V. (1995) Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin. *Biochem Biophys Res Commun.*, **209**, 760-7.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. and Marth, J. (1999) Essentials of Glycobiology, 1st Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (2004) Cancer Genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, **10**, 789-799.
- Vyakarnam, A., Dagher, S. F., Wang, J. L. and Patterson, R. J. (1997) Evidence for a role for Galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 4730-4737.
- Wakabayashi, M., Ito, T., Mitsushima, M., Aizawa, S., Ueda, K., Amachi, T., Kioka, N. (2003) Interaction of Ip-dlg/KIAA0583, a membrane-associated guanylate kinase family protein, with Vinexin and beta-catenin at sites of cell-cell contact. *J Biol Chem.*, **278**, 21709-14.
- Walzel, H., Blach, M., Hirabayashi, J., Kasai, K. I. and Brock, J. (2000) Involvement of CD2 and CD3 in Galectin-1 induced signaling in human Jurkat T-cells. *Glycobiology*, **10**, 131-140.
- Walzel, H., Schulz, U., Neels, P. and Brock, J. (1999) Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. *Immunol Lett* **67**, 193-202
- Wang, L., Jiang, Z., Fan, M., Xu, C., Chen, W., Shen, J. (2008) Changes of histology and expression of MMP-2 and nm23-H1 in primary and metastatic gastric cancer. *World J Gastroenterol*; **14**(10): 1612-1616.
- Weinberg, R. A. and Hanahan, D. (1996) The Molecular Pathogenesis of Cancer. Scientific American Molecular Oncology, Editors: Bishop, J. M. and Weinberg, R. A., Scientific American.
- Wells, V., Davies, D. and Malluci, L. (1999) Cell cycle arrest and induction of apoptosis by beta-galactoside binding protein (beta GBP) in human mammary cancer cells. A potential new approach to cancer control. *Eur J Cancer*, **35**, 978-983.
- Wennerberg, K., Ellerbroek, S.M., Liu, R.Y., Karnoub, A.E., Burridge, K., Der, C.J. (2002) RhoG signals in parallel with Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem.*, **277**(49), 47810-7.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, **22**, 474-481.
- Williams, A.J.K., Norcross, A.J., Chandler, K. A. and Bingley, P.J. (2006) Non-specific binding to protein A Sepharose and protein G Sepharose in insulin autoantibody assays may be reduced by the pre-treatment with glycine or ethanolamine. *JIM*, **316**, 170-173.
- Wilson, S. R., Gallagher, S., Warpeha, K., Hawthorne, S. J. (2004) Amplification of MMP-2 and MMP-9 production by prostate cancer cell lines via activation of protease-activated receptors. *The Prostate*, **60**(2), 168-174.
- Woo C.H., Lee Z.W., Kim B.C., Ha K.S., and Kim J.H. (2000) 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*, **348**, 525-30
- Woodcock, S.A., Rooney, C., Lontos, M., Connolly, Y., Zoumpourlis, V., Whetton, A. D., Gorgoulis, V.G. and Malliri, A. (2009) Src-induced Disassembly of Adherens Junctions requires Localized Phosphorylation and Degradation of the Rac Activator Tiam1. *Molecular Cell*, **33**, 639-653.
- Woods N.-B., Fahlman C., Mikkola H., Hamaguchi I., Olsson K., Zufferey R., Jacobson S. E., Trono D. and Karlsson S. (2000): Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells. *Blood* **96** (12): 3725-3733.
- Wu, M.H., Hong, T.M., Cheng, H.W., Pan, S.H., Liang, Y.R., Hong, H.C., Chiang, W.F., Wong, T.Y., Shieh, D.B., Shiau, A.L., Jin, Y.T., Chen, Y.L. (2009) Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res.* **7**(3), 311-8.
- Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Tanoue, A., Shooter, E. M., and Chan, J. R. (2005) Ras activation of a Rac1 exchange factor, Tiam1, mediates neurotrophin-3-induced Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 14889-14894.
- Yoo M. H., Woo C. H., You H. J., Cho S. H., Kim B. C., Choi J. E., Chun J. S., Jhun B. H., Kim T. S., Kim

- J. H. (2001) Role of the cytosolic phospholipase A₂-linked cascade in signaling by an oncogenic, constitutively active Ha-Ras isoform. *J. Biol. Chem.*, **276**, 24645–24653.
- You, H.J., Woo, C.H., Cho, I.E.Y, Cho, S.H., Yoo, Y.J., Kim, J.H. (2005) Roles of Rac and p38 kinase in the activation of cytosolic phospholipase A2 in response to PMA. *Biochem J.*, **388**, 527-35.
- Zhang, J., Li, X., Yao, B., Shen, W., Sun, H., Xu, C., Wu, J., Shi, Y. (2007) Solution structure of the first SH3 domain of human vinexin and its interaction with vinculin peptides. *Biochem Biophys Res Commun.*; **357**(4), 931-7.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP dependend cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.
- Zohn, I.E., Symons, M., Chrzanowska-Wodnicka, M., Westwick, JK., Der, C.J. Mas (1998) Oncogene Signaling and Transformation Require the Small GTP-Binding Protein Rac. *Mol Cell Biol.* **18**, 1225-1235.

10 Anhang

10.1 Abkürzungen und Einheiten

°C	Temperatur in Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
A	
A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AD	Aktivator-domäne
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B	
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaar
BPH	<i>Benign prostatic hyperplasia</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	
C ₃ [PO ₄] ₂	Calciumphosphat
CAP	<i>c-Cbl-associated protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
cm	Zentimeter
CMV	Humanes Cytomegalovirus
COS7	<i>CV-1 in Origin & carrying the SV-40 genetic material</i> ; Nierenzellen der grünen Meerkatze
cPLA2	cytosolische Phospholipase A2
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
D	
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	<i>Double strand</i>
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
E	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>

EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	<i>Extracellular Related Kinase</i>
et al.	et aliter (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
evtl.	eventuell
F	
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fwd	<i>forward</i>
G	
g	Gramm
<i>g</i>	Normal-Fallbeschleunigung (9,81 m*s ⁻²)
Galectin-1	Galectin-1
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>Guanine Nukleotid Exchange Factor</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H	
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HEBS	
HEPES	4-(2Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney</i> (embryonal transformierte Nierenzellen)
HRP	<i>Horseradish Peroxydase</i>
I	
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
IRES	Internal Ribosomal Entry-Site
J	
jun	Genprodukt des <i>avian sarcoma-Virus</i> Protoonkogens 17 (jun = japanisch für 17)
K	
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen (-paare)
kDa	Kilodalton
L	
l	Liter
LB	Luria Bertani (Bakterien Nährmedium)
M	
m	milli (10 ⁻³)
M	Molar, mol/l
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MEK	Mitogen- or Extracellular-regulated Kinase (MAP/ERK Kinase)
Mg ²⁺	Magnesiumion

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger</i> RNA
Myc	Genprodukt des <i>avian</i> myelocytomatosis-Virus Protoonkogens
N	
n	Nano (10 ⁻⁹)
NaAc	Natriumacetat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
Nt	Nukleotid
O	
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P	
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAK	<i>cAMP-dependent</i> Protein Kinase
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furioso</i>
PGK	Phosphoglycerat-Kinase aus <i>Saccharomyces</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Protein Kinase K
PSC	<i>Pancreatic stellate cells</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Raf	<i>Rapid fibrosarcoma</i> , Genprodukt des menschlichen c-raf-Protoonkogens
Ras	<i>rat sarcoma</i> , Genprodukt des menschlichen c-H-ras-Protoonkogens
rel.	<i>relativ</i>
rev	<i>reverse</i>
Rho	<i>Ras homology</i>
RISC	<i>RNA inducing silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S	
s	Sekunde
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
scr	<i>scrambled</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.E.M.	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardabweichung)
sh	<i>short hairpin</i>
SH3	<i>Src-homology</i>
SHIP2	<i>Scr-homology2 domain containing inositol 5-phosphatase 2</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
Src	Genprodukt des <i>sarcoma</i> -induzierenden Protoonkogens des Rous sarcoma-Virus
SRE	<i>Serum Response Element</i>
SRF	<i>Serum Response Factor</i>

ss *single strand*

T

Tab. Tabelle
Taq *Thermophilus aquaticus*
 TBE Tris-Borat-EDTA
 TBS Tris Buffered Saline
 TBS-T Tris Buffered Saline Tween
 TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
 Tiam1 T-lymphoma invasion and metastasis gene 1
 T_m mittlere Schmelztemperatur
 Tris 2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propandiol
 TRITC Tetramethylrhodaminisothiocyanat
 Triton X-100 Alkylphenylpolyethylenglykol
 Tween 20 Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat

U

U *Unit* (Enzymeinheit)
 u. a. unter anderem
 üN über Nacht
 UV Ultra-Violett

V

V Volt
 vgl. vergleiche
 v/v *volume per volume*
 Vinexin- β Vinexin- β

W

W Watt
 WAVE2 Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin homologous protein
 WHO *World Health Organisation*
 w/v *weight per volume*

Y

YTHS *Yeast Two Hybrid Screen*

Z

z. B. zum Beispiel
 zzgl. zuzüglich

10.2 Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

1-Buchstabencode			
3-Buchstabencode			
		Aminosäure	Polarität der Seitenkette
A	Ala	Alanin	nonpolar
C	Cys	Cystein	nonpolar
D	Asp	Asparaginsäure	polar
E	Glu	Glutaminsäure	polar
F	Phe	Phenylalanin	nonpolar
G	Gly	Glycin	nonpolar
H	His	Histidin	polar
I	Ile	Isoleucin	nonpolar
K	Lys	Lysin	polar
L	Leu	Leucin	nonpolar
M	Met	Methionin	nonpolar
N	Asn	Asparagin	polar
P	Pro	Prolin	nonpolar
Q	Gln	Glutamin	polar
R	Arg	Arginin	polar
S	Ser	Serin	polar
T	Thr	Threonin	polar
V	Val	Valin	nonpolar
W	Trp	Tryptophan	nonpolar
Y	Tyr	Tyrosin	polar
B	Asx	Asparagin/-säure	
J	Xle	Iso-/Leucin	
X	Xaa	Unbekannte AS	
Z	Glx	Glutamin/-säure	

10.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sandra Karatas
Geburtsdatum	15. Mai 1981
Geburtsort	Wuppertal
Familienstand	verheiratet
Geburtsname	Harke

Hochschulausbildung

seit 03/2007	Promotion am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der Henrich-Heine-Universität, Düsseldorf Thema „Einfluss von Vinexin-β und Galectin-1 auf die Tiam1-vermittelte Signalweitergabe“
03/2006 – 01/2007	Diplomarbeit am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf Thema „Charakterisierung der Tiam1-Galectin-1-Interaktion: Spezifität und funktionelle Relevanz“.
10/2000 – 01/2007	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf Abschluss: Diplom-Biologin

Schulausbildung

08/1991 – 06/2000	Carl-Fuhlrott-Gymnasium in Wuppertal Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
-------------------	--

10.4 Eigene Vorveröffentlichungen zur Dissertation

Tagungsbeiträge

Karatas, S., Fischer, A., Nockemann, S., Ulbrich, E., Gabbert, H.E. & Engers, R. The adaptor protein Vinexin- β is a new binding partner of the metastasis-regulating protein Tiam1. (Poster) 15. *Internationaler AEK-Kongress*, Berlin (2009).

Karatas, S., Fischer, A., Nockemann, S., Ulbrich, E., Gabbert, H.E. & Engers, R. Vinexin- β is a new and Epidermal Growth Factor-stimulated binding partner of the Rac-specific activator Tiam1. (Abstract) *Der Pathologe*, Supplement1, 2009. (Vortrag) 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., Freiburg im Breisgau (2009).

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die mit ihrer Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. H. E. Gabbert danke ich für die Möglichkeit die Arbeit am Institut für Pathologie anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Rainer Engers für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, die Bereitstellung des interessanten Themas, für seine sehr gute wissenschaftliche Betreuung, seine stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung sowie für die Erstellung des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. E. Lammert danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. W. Schulz für die Bereitstellung des pRL-TK-Vektors, Laura Taylor und D. Bar-Sagi für hSos, Y. Kloog für die Galectin-1(L11A)-Mutante, I. Trompeter für die Hilfe bei den Luciferase-Messungen, Stefan Schmitt für die Einführung an das konfokale Mikroskop und Meike Winter für eine erste Einführung in die FACS-Analyse. Zudem bedanke ich mich bei Sigrid Khalil, Sandra Tränkner und Lena Severiens für ihre tatkräftige technische Unterstützung.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt Dr. Michèle Hoffmann für ihre Hilfe. Immer und zu jeder Zeit. Für Ihre Ratschläge, Ideen, Unterstützung, Geduld...und d. e. o. a. T. i. d. A..

Besonders danke ich auch Eva Müller – einfach weil sie Eva ist und weil ich mir keine andere „Mitstreiterin“ gewünscht hätte, sowie allen, die zu einer unvergesslichen Zeit innerhalb und außerhalb des Labors beigetragen haben: Michèle, Vera, Friederike, Anne, Carola, Lena, Magdalena, Kathinka, Katja, Sabrina außerdem der wechselnden Besetzung der AG Heikhaus. Eva und Michèle für die anregenden Diskussionen „oben im Zimmer“. Eva, Michèle, Vera, Carola, Lena und Magdalena für die vielen Lachanfälle, die nicht selten mit Bauchschmerzen endeten 😊

Dr. Slava Ziegler danke ich für unermüdliche Motivation und Trost, wenn die Ergebnisse nicht so wollten, wie ich. Außerdem für wertvolle Ratschläge & Tipps, ihre Herzengüte und das Korrekturlesen.

Dr. Meike Winter für das Mutmachen und Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonders meinen Freunden für SEHR willkommene Ablenkungen.

Çok teşekkürler Ömer ve Semine Karataş. Elerinizi öperim.

Von Herzen meinen Eltern und meiner Schwester für ihre stete Unterstützung während dieser Arbeit und darüber hinaus, ich umarme Euch!

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann Bora, der immer an das Gelingen dieser Arbeit geglaubt hat; für seine Motivation, Unterstützung und Geduld in jeder Hinsicht. Er ist tatsächlich immer noch an meiner Seite (♥). Ihm gilt das größte Dankeschön!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorgelegte Dissertation eigenständig, ohne unerlaubte Hilfe und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die vorgelegte Dissertation ist in der vorliegenden oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht worden. Ich habe bislang keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den
