

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Helmut Erich Gabbert

**Funktionelle Relevanz des Tiam 1 / Rac 3-Signalwegs für die
Progression des Prostatakarzinoms:**

Eine in vitro-Untersuchung am Beispiel der hormonresistenten
Prostatakarzinomzelllinie PC3

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Friederike Damm

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Engers
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Ahmadian

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Prostatakarzinom und seine Prognoseparameter	1
1.2	Die Metastasierung	7
1.3	T-Lymphoma invasion and metastasis Gen 1	12
1.4	Rho-GTPasen.....	16
1.5	Rac3	17
1.6	Fragestellung	21
2	Material	23
2.1	Laborgeräte	23
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.3	Chemikalien und gekaufte Lösungen	25
2.4	Puffer und Lösungen	26
2.5	Reagenziensets („Kits“).....	30
2.6	Antikörper.....	31
2.7	Zellen	32
2.8	Medien, Antibiotika, Zusätze und Lösungen der Zellkultur	33
2.9	Konstrukte	33
2.10	Software	33
3	Methoden.....	34
3.1	Zellbiologische Methoden	34
3.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	34
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl	34
3.1.3	Isolation von Proteinen aus Zellen	35
3.1.4	Transfektion	36
3.1.5	Selektion der Zellen	36
3.1.6	Adhäsionsassay	37
3.1.7	Migrationsassay.....	38
3.1.8	Invasionsassay	40
3.1.9	XTT- Proliferationsassay	41

3.2	Proteinbiochemische Methoden	42
3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	42
3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
3.2.3	Western-Blot-Verfahren.....	43
3.2.4	Immunologischer Proteinnachweis	44
3.2.5	Nachweis phosphorylierter Proteine	45
3.2.6	Immunfluoreszenzuntersuchungen.....	46
3.2.7	Zymographie	47
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	48
3.3.1	Transformation	48
3.3.2	Präparation der transformierten Kolonien.....	48
3.3.3	Fällung und Aufbereitung der DNA.....	49
3.3.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	49
3.3.5	Herstellen einer Glycerin-Kultur.....	49
3.3.6	Isolation von Plasmid-DNA	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Transfektionsnachweis	51
4.2	Einfluss der Konstrukte auf den Zellphänotyp	53
4.3	Immunfluoreszenz	56
4.4	Adhäsionsassay.....	58
4.5	Migrationsassay	59
4.6	Invasionsassay	59
4.7	Nachweis von TIMPs und MMPs	60
4.8	Zellproliferation.....	63
4.9	Identifikation nachgeschalteter Signalwege	65
4.9.1	Nuclear factor kappa B (NFκB)	65
4.9.2	Cyclin D1	66
4.9.3	Akt.....	66
4.9.4	c-JUN NH ₂ -terminale Kinase.....	67
4.9.5	ERK-Kinase	68
4.9.6	P38- Kinase	68

4.9.7	70 kDa-ribosomale-S6-Kinase	69
5	Diskussion	71
5.1	Funktionelle Relevanz des Tiam1/Rac3-Signalwegs	71
5.2	Sekretion von MMPs und TIMPs	76
5.3	Signalwege downstream von Tiam1/Rac3	78
6	Zusammenfassung	80
7	Literaturverzeichnis	81

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
Akt	Syn.: Proteinkinase B
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serum-Albumin
C1199-Tiam1	Konstitutiv aktives Tiam1
CAAX-Box	C = Cystein; A = aliphatische Aminosäure; X = beliebige Aminosäure
CC	„Coiled-coil“-Region in der Tiam1-Genstruktur
cDNA	komplementäre DNS
CDK	Cyclin-dependent Kinase
C-terminal	Carboxy-terminal
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
E.coli	Escherichia coli
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
Ex	„Extended“-Region in der Tiam1-Genstruktur
Et al.	Et alii
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszenzisothiocyanat
Fl-Tiam	Volllängen-Tiam1
GAF	Guaninnukleotid-Aktivierungsfaktoren
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktoren
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HRP	Horseradish-peroxidase
JUN-Kinase	c-JUN NH ₂ -terminale Kinase
kDa	Kilo-Dalton (Molekularmasse)
MAPK	Mitogen aktivierten Proteinkinase
MDCK	Madin-Darby canine kidney (Zelllinie)
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mock	Syn.: leerer Plasmidvektor

mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
µl	Mikroliter
NFκB	Nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
N-terminal	Amino-terminal
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphate buffered saline
PDK	Phosphoinositide-dependent-kinase
PDZ	Postsynaptic density-96/Discs large/Zona occludens-1-Domäne
PH-Domäne	Pleckstrin homologe Domäne
PMS	Pyrazin-Methyl-Sulfat
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
p70S6-K	70kDa-ribosomale-S6-Kinase
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Rac wt	Wildtyp Rac
Ras	Rat sarcoma
RBD	Ras bindende Domäne
Rho	Ras-homologous
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rotations per minute
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
siRNA	Small interfering RNA
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming growth factor
Tiam	T-lymphoma invasion and metastasis gene
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumour necrosis factor
TNM	Tumour, node and metastasis
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
V12 Rac	Konstitutiv-aktives Rac
vgl	vergleiche
wnt	wingless

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom und seine Prognoseparameter

Dem Prostatakarzinom kommt in unserer heutigen, immer älter werdenden Gesellschaft, eine zunehmende Bedeutung zu. Dies schlägt sich auch in den epidemiologischen Statistiken nieder. Im Jahr 2011 stand das Prostatakarzinom an erster Stelle der erwarteten Krebs-Neuerkrankungsfälle, und an dritter Stelle der erwarteten Todesfälle durch Krebserkrankungen bei Männern in den westlichen Industrienationen (Jemal A., 2011).

Dies liegt insbesondere daran, dass das Alter als der bedeutendste Risikofaktor für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms gilt. Der Altersgipfel der Inzidenz liegt bei 70-74 Jahren (Gann P.H., 2002). Mit der Verbesserung der Lebensumstände und der medizinischen Möglichkeiten erreichen heute immer mehr Männer dieses Alter.

Weitere anerkannte Risikofaktoren sind -abgesehen vom Alter-, die ethnische Zugehörigkeit und die positive Familienanamnese (Gann P.H., 2002). So ist für Afroamerikaner das Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, um 60% höher und die Mortalität doppelt so hoch wie bei weißen Amerikanern. Für die asiatische Bevölkerung Chinas hingegen ist das Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, am geringsten.

Eine positive Familienanamnese eines Verwandten ersten Grades erhöht das Risiko für ein Prostatakarzinom um das 2- bis 3-fache (Hsing A.W., 2000; Gann P.H., 2002).

Auch die Umweltfaktoren, welche die westliche Lebensweise ausmachen, wie zum Beispiel der hohe Gehalt an Fetten in der Nahrung stehen in einem Zusammenhang mit der Entstehung eines Prostatakarzinoms. Dies beweisen unter anderem Migrationsstudien, die zeigen, dass das Risiko für ein Prostatakarzinom durch Migration ansteigen kann und sich dem Risiko des Migrationslandes innerhalb von einer Generation anpasst (Shimizu H., 1991) (Gann P.H., 2002).

Ebenso wird chronischen oder rezidivierenden Entzündungen der Prostata eine Rolle bei der Karzinogenese zugeschrieben. So besteht bei rezidivierenden Gonorrhö-Erkrankungen ein bis zu 3,3-fach höheres Risiko für ein Prostatakarzinom (Hayes R.B., 2000).

In der Diagnostik und Therapie gibt es vor allem zwei Merkmale, die das Prostatakarzinom auszeichnen und denen ein hoher Stellenwert zukommen muss: Der hohen Prävalenz und dem sehr unterschiedlichen Verlauf. In Bezug auf die Prävalenz zeigte sich beispielsweise in einer Autopsie-Studie, dass bei 8,8% der Männer zwischen 30 und 40 Jahren und 31,7% der Män-

ner zwischen 60 und 70 Jahren kleine Prostatakarzinome nachweisbar waren. Die Rate der hochgradigen intraepithelialen Neoplasien der Prostata lag zwischen dem sechzigsten und siebzigsten Lebensjahr bei 45,4% (Sánchez-Chapado M., 2003). Diese Karzinome können auf Grund ihres langsamen Wachstums oder der Abwehrlage des Organismus aber „latent“ bleiben. Das bedeutet, sie sind existent, führen aber im Laufe des Lebens nicht zur manifesten Erkrankung. Selbst manifeste Prostatakarzinome sind, auf Grund des hohen Alters der Patienten oder ihres langsamen Wachstums, oft nicht die Todesursache. Andererseits kann ein aggressives Prostatakarzinom bereits früh lymphogen und hämatogen metastasieren, was die Prognose des Patienten drastisch verschlechtert und letztlich zu einem verfrühten Tod führen kann. Welchen Verlauf ein bestimmtes Prostatakarzinom nehmen wird, ist schwer voraus zu sagen, da es an suffizienten Marker für die Prognose fehlt. Dies führt zu einem Zwiespalt, der sich für Diagnostik und Therapie ergibt. Es gilt, die Patienten, die nicht an ihrem Prostatakarzinom versterben würden, nicht durch ein strenges Therapieregime zu belasten; gleichzeitig aber –bei schwer vorhersagbarem Verlauf- eine ausreichende Therapie zu gewährleisten. Im Jahr 2008 ging man davon aus, dass circa 30% der durch radikale Prostatektomie entfernten Tumore –rückblickend- keiner solch invasiven Behandlung bedurft hätten (Sardana G., 2008).

Die bislang wichtigsten etablierten Prognosefaktoren sind der „Gleason-Score“, der präoperative „PSA-Wert“, die „TNM-Klassifikation“ und der „R-Status“. Diese Parameter sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Das Prostatagewebe sezerniert eine Serin-Protease zur Verflüssigung des Ejakulats. Diese wird Prostata-spezifisches-Antigen, kurz PSA genannt. In den 1980er Jahren wurde ein Verfahren zur PSA-Bestimmung aus dem Blut entwickelt. Beim Prostatakarzinom kommt es zum Anstieg des PSA-Spiegels. Dies geschieht sowohl durch Zerstörung der normalen Zellstrukturen, als auch durch Sezernierung von PSA durch Karzinomzellen. Nach der Einführung des Verfahrens in die Diagnostik, wurde der PSA-Wert zunächst in der Nachsorge von Prostatakarzinompatienten bestimmt: Nach erfolgreicher Erstbehandlung des Prostatakarzinoms fällt der PSA-Wert ab. Er wird im Rahmen der nachfolgenden Kontrollen regelmäßig bestimmt. Ein erneuter Anstieg kann auf ein Rezidiv hinweisen.

Im weiteren Verlauf wurde seit Anfang der 1990er Jahre der Marker auch mehr und mehr zur Früherkennung im Rahmen eines „PSA-Screenings“ eingesetzt (Sardana G., 2008).

Das PSA-Screening hat keine hohe Spezifität in der Diagnostik eines Prostatakarzinoms, da unter anderem auch eine benigne Prostatahyperplasie oder eine Prostatitis erhöhte Werte ver-

ursachen können. Durch Differenzierung in ungebundenes und gebundenes PSA oder die Anstiegsgeschwindigkeit des PSA-Wertes lässt sich der positiv prädiktive Wert des Markers jedoch verbessern (Hautmann, 2006).

Als prognostisch wichtiger Marker hat sich der präoperative PSA-Wert etabliert. Dabei sind hohe präoperative PSA-Werte mit einer fortgeschrittenen Erkrankung und schlechterem klinischen Verlauf verbunden (Sardana G., 2008).

Prostatakarzinome sind zu 98% Adenokarzinome, die vorwiegend in der peripheren Zone der Prostata entstehen. Kleine Karzinome sind eher uniform und hochdifferenziert, größere Karzinome hingegen häufig multifokal und pluriform mit unterschiedlich differenzierten Anteilen (Böcker, 2004).

1966 wurde von Donald F. Gleason ein Gradingssystem eingeführt, welches – mit einigen Modifikationen- auch heute noch Verwendung findet und den Aspekt des multifokalen und pluriformen Wachstums berücksichtigt. Der Gleason-Score ist einer der wichtigsten und aussagekräftigsten Parameter der Prognosebestimmung (Epstein J.I., et al., 2005). Dabei wird das Drüsenmuster bei geringer Vergrößerung bewertet. Gleason klassifizierte fünf verschiedene Drüsenmuster (Abbildung 1).

Im Rahmen der Diagnostik wendet man den Gleason-Score zunächst bei der histologischen Klassifikation der entnommenen Stanzbiopsien an. Der Wert des am häufigsten vertretenen Musters und der Wert des aggressivsten Musters werden dann addiert und bilden den Gleason-Score der entnommenen Biopsie. Nach radikaler Prostektomie wird auch der Gleason-Score des Resektats bestimmt. Dabei werden die Werte des am häufigsten und am zweithäufigsten vertretenen Musters addiert (Epstein J.I., et al., 2005).

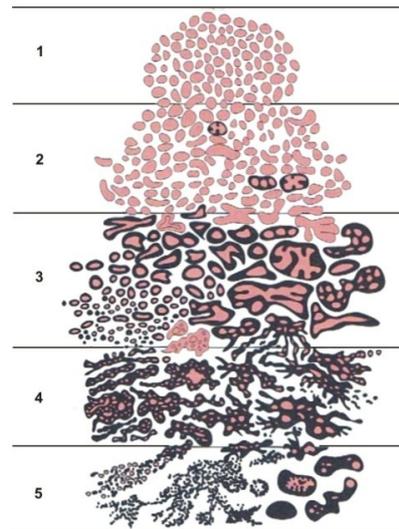


Abbildung 1: Schema der Einteilung des Drüsenmusters beim Prostatakarzinoms in fünf verschiedene Grade nach Gleason.
Graphik: Böcker, 2004

Ein weiterer etablierter Prognosefaktor ist das TNM-Stadium. Das Prostatakarzinom wird nach der TNM-Klassifikation der AJCC in mehrere Stadien unterteilt. Zunächst wird eine klinische TNM-Klassifikation des Tumors vorgenommen (Tabelle 1). Nach der Resektion des Tumors wird außerdem eine TNM-Klassifikation nach pathologischen Kriterien erstellt (Cheng L., 2012).

Die Stadien T1-2, N0, M0 entsprechen dabei einem Karzinom, welches die Prostatakapself noch nicht durchbrochen hat und somit noch lokal begrenzt ist. Die Stadien T3-4, N0, M0 beinhalten eine Infiltration in Nachbarstrukturen. Man spricht von einem lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom. Alle Stadien mit regionären Lymphknotenmetastasen (N1) oder Fernmetastasierung (M1) werden als fortgeschrittenes bzw. metastasiertes Prostatakarzinom bezeichnet (DGU, 2009).

Mit fortschreitender Ausbreitung des Prostatakarzinoms verschlechtert sich die Prognose des Patienten.

T	Primärtumor
TX	Nicht zu beurteilen
T0	Nicht vorhanden (kein Anhalt für Primärtumor)
T1	Klinisch nicht erkennbar (weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar)
T1a	Zufällig in entferntem Gewebe gefunden (inzidenter Tumor), in 5% des Gewebes oder weniger

	T1b	Zufällig in entferntem Gewebe gefunden (inzidenter Tumor), in mehr als 5% des Gewebes
	T1c	Durch Nadelbiopsie (z.B. wegen erhöhtem PSA) diagnostiziert
T2		Begrenzt auf die Prostata
	T2a	In höchstens der Hälfte eines Prostatalappens
	T2b	In mehr als der Hälfte eines Prostatalappens
	T2c	In beiden Prostatalappen
T3		Ausgebreitet durch die Prostatakapsel
	T3a	Ein- oder beidseitig
	T3b	In die Samenblase(n) eingewachsen
T4		Eingewachsen in andere Nachbarstrukturen als die Samenblasen
N		Regionäre Lymphknoten
	NX	Nicht zu beurteilen
	N0	Nicht befallen (kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen)
	N1	Befallen (regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden)
M		Fernmetastasen
	MX	Nicht zu beurteilen
	M0	Nicht vorhanden (kein Anhalt für Fernmetastasen)
	M1	Vorhanden
	M1a	In nicht-regionären Lymphknoten
	M1b	In Knochen
	M1c	An anderen Stellen des Körpers

Tabelle 1: Klinische TNM-Klassifikation beim Prostatakarzinom (Cheng L., 2012) (Graphik nach: Sökeland J., 2007)

Auch der Erfolg der angestrebten kompletten Resektion ist von großer Bedeutung. Nach radikaler Prostektomie kommt es bei 25% der Patienten zu einem Rezidiv (Belka C., 2006). Dieses entsteht oftmals aus den verbleibenden Anteilen bei einer nicht kompletten Resektion des Karzinoms. Um diesen Sachverhalt abzubilden, hat man den „R-Status“ eingeführt. Eine komplette Resektion ohne makroskopisch oder mikroskopisch verbleibende Karzinomreste wird als R0-Resektion bezeichnet. Sind die äußeren Schnittträger in der mikroskopischen Beurteilung nicht tumorfrei aber makroskopisch wurden alle Anteile entfernt, handelt es sich um eine R1-Resektion mit erhöhter Rezidivgefahr. Verbleiben bereits makroskopisch erkennbar weitere Anteile, wird dieses als R2-Status bezeichnet. Entsprechend des R-Status ändert sich die Therapie und die Prognose.

Um zu verdeutlichen, wie wichtig eine präzise Prognosebeurteilung für den am Prostatakarzinom erkrankten Patienten sein kann, soll im Folgenden kurz die große Bandbreite der Therapieoptionen charakterisiert werden.

In der Therapie des Prostatakarzinoms versucht man den Anforderungen die durch die hohe Prävalenz und den sehr unterschiedlichen Progress gestellt werden, gerecht zu werden. Es wurden verschiedene Therapiekonzepte entwickelt in denen nicht nur die Prognose sondern auch die gesundheitliche Konstitution des Patienten sowie soziale Faktoren Berücksichtigung finden (Ramsay A.K., 2009) . Man unterscheidet konservative und kurative Ansätze.

Es gibt zwei wichtige konservative Vorgehensweisen: Bei Patienten, deren PSA-Wert unter 10 ng/ml liegt, deren Gleason-Score kleiner oder gleich 6 ist, die sich in den Stadien T1c und T2a befinden oder bei denen der Tumor in 2 oder weniger Stanzeln nachgewiesen wurde bzw. weniger als 50% einer Stanze ausmacht, kommt das „Active surveillance“-Konzept in Frage. Dieses beinhaltet ein abwartendes Verhalten mit regelmäßigen PSA-Wert-Messungen und digital-rektalen Untersuchungen, sowie erneute Biopsien alle 1-2 Jahre oder früher, wenn sich Veränderungen in PSA-Wert oder der digital-rektalen Untersuchung finden. Eine Progression bedingt dann die Entscheidung zur kurativen Therapie.

Ein weiteres konservatives Vorgehen stellt das „Watchful-Waiting“ dar. Dieses kann bei Patienten angewandt werden, deren Lebenserwartung weniger als 10 Jahre beträgt, die multimorbide sind und bei denen das Karzinom zufällig entdeckt wurde und nur ein geringes Volumen aufweist. Diese Patienten werden erst bei symptomatischer Progression palliativ behandelt (DGU, 2009).

In der kurativen Therapie verfolgt man, je nach Stadium verschiedene Ansätze. So kann bei lokalisiertem Prostatakarzinom eine radikale Prostatektomie – auch laparoskopisch oder Computer-gestützt - durchgeführt werden. Alternativ stehen Hochvolt-Radiotherapie oder Brachytherapie zur Verfügung.

Bei lokal fortgeschrittenem Karzinom kommen eher Hormontherapie und Radiotherapie in Frage. Liegt bereits eine Metastasierung vor, ist die Hormontherapie die Methode der Wahl. Zusätzlich kann eine Chemotherapie z.B. mit Doxetaxel durchgeführt werden.

Androgene sind die wichtigsten Regulatoren des Prostatazellwachstums und der Differenzierung. In der Hormontherapie kann entweder direkt mit Anti-Androgenen behandelt werden oder auf Ebene der Epiphyse die Ausschüttung der Regulationshormone beeinflusst werden.

Auf die Einleitung einer Hormontherapie folgt oft eine Phase der Regression, da das Wachstum des Karzinoms nicht mehr durch Androgene stimuliert wird. Nach durchschnittlich zwei Jahren entwickeln sich allerdings in vielen Fällen hormonrefraktäre Anteile des Prostatakarzinoms und es kommt zu einem Androgen-unabhängigen Wachstum (Ramsay A.K., 2009).

2010 hat die AJCC eine neue Stadieneinteilung für das Prostatakarzinom eingeführt, in die neben der TNM-Klassifikation auch die Parameter Gleason-Score und präoperativer PSA-Wert einfließen. Dennoch können mittels dieser Parameter oftmals nur ungenaue Aussagen über den weiteren Verlauf und die Prognose des Patienten getroffen werden. Um unter den Therapiemöglichkeiten die Beste für die oft schon älteren Patienten herauszufinden, wäre es allerdings wichtig, die Aggressivität des Tumors möglichst exakt einschätzen zu können. Daher wird seit Jahren intensiv nach neuen molekularen Markern gesucht, die zusammen mit den bereits etablierten Parametern eine bessere Aggressivitätsbeurteilung des Prostatakarzinoms erlauben.

Dabei konnte in den Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Guaninnukleotidaustauschfaktor Tiam1 sowohl in hochgradigen intraepithelialen Neoplasien der Prostata als auch in Prostatakarzinomen verstärkt exprimiert wird und eine starke Überexpression in Prostatakarzinomen mit einer verringerten erkrankungsfreien Überlebenszeit nach radikaler Prostatektomie assoziiert ist (Engers R., 2006 a).

Ähnliches zeigte sich auch für die kleine GTPase Rac, deren Guaninnukleotidaustauschfaktor Tiam1 ist. Auch hier wurde eine signifikant höhere Expression in intraepithelialen Neoplasien und Prostatakarzinomen gefunden. Die Rac-Überexpression war dabei signifikant assoziiert mit perineuraler Invasion, einem hohen Gleason-Score und einer erhöhten Rezidivrate. Es konnte gezeigt werden, dass die Rac-Überexpression vor allem aus einer Überexpression der Rac3-Isoform resultiert. Diese Überexpression von Rac im Prostatakarzinom kann als unabhängiger Marker für eine verminderte erkrankungsfreie Überlebenszeit herangezogen werden (Engers R., 2007).

1.2 Die Metastasierung

Ein Primärtumor ist nur in 10% der Fälle für den Tod eines Patienten verantwortlich. In bis zu 90% der Fälle sind es Metastasen und die damit einhergehenden Funktionseinschränkungen anderer Organe, die den Tod verursachen (Mehlen P., 2006).

Obwohl die genetischen Ursachen der verschiedenen Tumore sehr variieren, sind die Schritte, die zur Metastasierung durchlaufen werden müssen, ähnlich (Woodhouse E.C., 1997).

In einem ersten Schritt kommt es zum Verlust der Adhäsion der Zellen des Tumorzellverbandes untereinander.

E-Cadherine sind die wichtigsten Adhäsionsmoleküle für die Aufrechterhaltung eines epithelialen Zellverbandes. Mit ihrer extrazellulären Komponente binden sie an die E-Cadherine der Nachbarzelle und mit der intrazellulären, zytoplasmatischen Komponente an β -Catenin oder Plakoglobin und dann über α -Catenin an das Aktinzytoskelett (Yap A.S., 1997). Der E-Cadherin-Komplex hat aber nicht nur die Funktion der Adhäsion. Vielmehr ist seine Regulation auch in multiple Signalwege eingebunden.

Die Theorie des epithelial-mesenchymalen Übergangs beschreibt ein entwicklungsbiologisches „Programm“ der Zellen, welches eine Zellwanderung durch den Übergang von einem epithelialen in einen mesenchymalen Zellphänotyp möglich macht. Dabei münden multiple Signalwege in einem initialen Schritt: der Herunterregulation von E-Cadherin. Man geht davon aus, dass beim Vorgang der Metastasierung dieses entwicklungsbiologisch-relevante „Programm“ in Teilen wieder aktiviert wird, was auch die koordinierten und hoch komplexen Vorgänge bei der Metastasierung erklären kann (Guarino M., 2007).

Mutationen in den Genen oder Modifikationen der zum Cadherin-Komplex gehörenden Proteine können einen invasiveren Phänotyp induzieren (Mareel M., 1997). Eine immunhistochemische Studie zeigte eine verminderte E-Cadherin-Expression in 50% der Prostatakarzinome (Umbas R., 1992).

Nach dem Verlust der Adhäsion zwischen den Tumorzellen, können sich metastatische Subklone lösen, aktiv in das umgebende Gewebe infiltrieren und sich darin fortbewegen. Die Fortbewegung in der extrazellulären Matrix wird auch als „Migration“ bezeichnet.

Die Migration von Zellen verlangt eine koordinierte Aktion des Aktin-Zytoskeletts sowie eine Interaktion zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix.

Bei der Migration wird das so genannte „*leading edge*“ der Zelle, welches in Richtung der Migration neue Kontakte ausbildet, und das so genannte „*trailing edge*“, an welchem die Zelle die Kontakte löst, unterschieden (Alberts B., 2002).

Im Bereich des *leading-edge* entwickelt die Zelle Filopodien. Integrine an der Spitze der Filopodien binden an die extrazelluläre Matrix und initiieren die Bildung von ersten Adhäsionskontakten. Es folgt die Ausbildung von Lamellipodien (Giancotti F.G., 1999).

Die Adhäsionskontakte des *leading-edge* werden gefestigt. Gleichzeitig bilden sich in der Zelle Aktin-Stressfasern, die im Folgenden für eine Kontraktion des *trailing-edge* sorgen. Adhäsionskontakte des *trailing-edge* werden gelöst und die Zelle in die Lage versetzt, ihr Zytoplasma zum *leading-edge* zu verlagern. Dieser Vorgang wiederholt sich viele Male, und die Zelle kann so durch die extrazelluläre Matrix migrieren (Alberts B., 2002).

Die Regulation der Zell-Matrix-Kontakte geschieht vor allem über eine Modulation des Integrin-Netzwerks (Giancotti F.G., 1999). Integrine setzen sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen und jede Kombination von Untereinheiten besitzt spezifische Bindungspartner. Die meisten Integrine binden an mehrere extrazelluläre Matrix-Proteine wie zum Beispiel Fibronectin, Laminin, Kollagene oder Vitronectin.

Integrine dienen nicht nur der Interaktion mit der extrazellulären Matrix. Sie erfüllen darüber hinaus eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion der Zelle. So können sie zum Beispiel über eine Aktivierung der Rho-ähnlichen kleinen GTPasen die Zellmigration regulieren. Von den Rho-ähnlichen kleinen GTPasen induziert dabei Rac die Ausbildung von Lamellipodien, Cdc42 die Ausbildung von Filopodien und Rho die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe und assoziierter Stressfasern (Giancotti F.G., 1999) (Hall A., 1998).

Für die aktive Infiltration der Zellen in die extrazelluläre Matrix brauchen diese nicht nur die Möglichkeit zur Migration im Gewebe, es muss vielmehr auch eine Degradierung der extrazellulären Matrix stattfinden.

Aus der großen Gruppe der Proteasen stellten sich für den Metastasierungsprozess besonders die Matrix-Metallo-Proteinase (MMPs) als relevant heraus. Diese Gruppe von zinkabhängigen Endopeptidasen lässt sich noch einmal in drei Untergruppen unterteilen, von denen die Gelatinasen oder auch Typ IV-Kollagenasen die vermutlich größte Rolle bei der Metastasierung spielen (Ray J.M., 1994). Das wird unter anderem auch darauf zurückgeführt, dass Typ IV-Kollagen einen wichtigen Bestandteil der Basalmembran bildet (Yurchenco P.D., 1992). Es gibt eine 72 kDa große Gelatinase A, welche Matrix-Metallo-Proteinase 2 genannt wird, und die 92 kDa große Gelatinase B, auch Matrix-Metallo-Proteinase 9 genannt.

Beide werden als Proenzyme von den Zellen sezerniert und durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Aktivität der Matrix-Metallo-Proteinasen kann durch ihre Antagonisten, die *Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), inhibiert werden. Die Gruppe der TIMPs besteht aus vier strukturell ähnlichen Proteinen zwischen 21 und 29 kDa.

TIMP1, 2 und 4 werden in löslicher Form sezerniert und chelatieren über das N-terminale Cystein das Zinkatom im aktiven Zentrum der MMPs (Visse R., 2003). Es können jedoch auch bereits die Pro-MMPs inhibiert werden. Hierbei inhibiert TIMP1 spezifisch Pro-MMP9. TIMP2 und 4 inhibieren spezifisch Pro-MMP2.

Es besteht ein fein reguliertes, dynamisches Gleichgewicht, welches sich in Abhängigkeit von der zellulären Mikroumgebung einstellt. So wird beispielsweise die Transkription der MMPs vor allem durch lokale Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert (Ray J.M., 1994). Im Rahmen physiologischer Prozesse- wie der Wundheilung der Haut- ist es notwendig, dass temporär die Transkription und Aktivität der MMPs gegenüber der der TIMPs überwiegt, um die umfangreiche Modulation der extrazellulären Matrix während des Heilungsprozesses zu ermöglichen (Bellayr I.H., 2009).

Pathophysiologisch kann ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs aber auch die Invasivität von Tumoren in großem Maße beeinflussen. So konnte zum Beispiel am Model einer Nierenkarzinomzelllinie gezeigt werden, dass eine Expressionssteigerung der TIMPs eine Invasivitätshemmung bewirkt (Engers. R., 1999).

Nach der Invasion durch die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix, können die Tumorzellen im Rahmen der Intravasation in Blut- oder Lymphgefäße gelangen. Sie werden durch den Blut- oder Lymphstrom in das nächste Kapillarbett oder die nächste Lymphknotenstation verschleppt. Dort werden sie in den kleinsten Gefäßen arretiert. Es findet dann eine Invasion und Migration in die extrazelluläre Matrix des umgebenden Organgewebes statt. Dort können die Tumorzellen vom Immunsystem eliminiert werden oder es bildet sich, abhängig vom Umgebungsmilieu eine Metastase des Primärtumors aus. Dazu kann es auch nach vielen Jahren noch kommen, da die Tumorzellen im umgebenden Organgewebe auch in einen Zustand übergehen können, der als „*Tumor-Dormancy*“ bezeichnet wird. Die Tumorzellen verbleiben dabei in der G0-Phase des Zellzyklus. Kommt es dann zu einer Änderung des Mikromilieus, kann die Zelle wieder in die aktive Phase des Zellzyklus übergehen (Engers R., 2000).

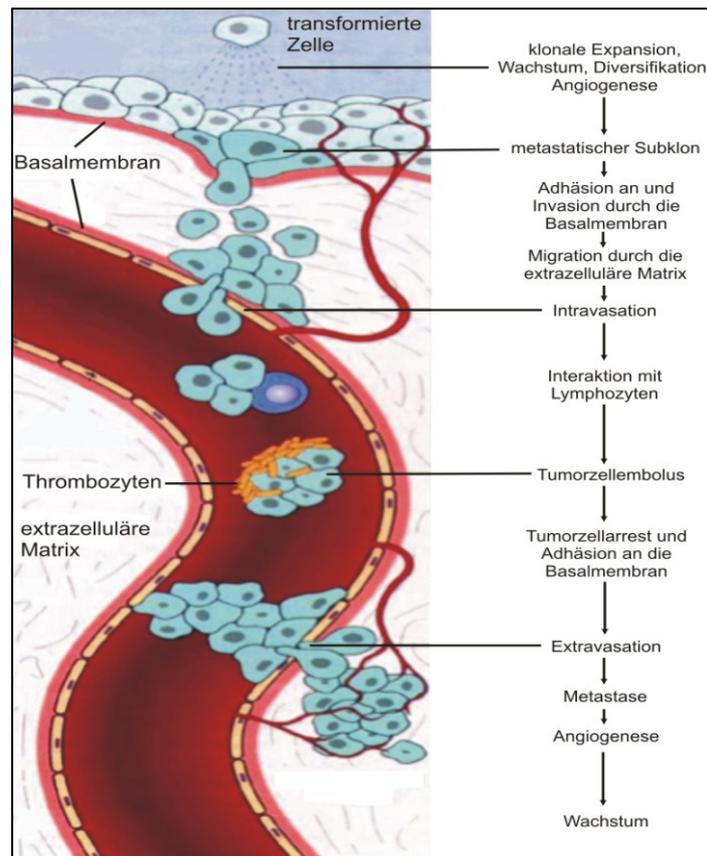


Abbildung 2: Vorgang der Metastasierung. Graphik nach: Kumar V., 2004

Alle diese Schritte müssen durchlaufen werden, damit sich eine Metastase ausbilden kann. Es ist daher nicht verwunderlich, dass der Prozess der Metastasierung relativ ineffizient ist. Weniger als 0,05% der zirkulierenden Tumorzellen werden zur Grundlage einer Sekundärabsiedlung (Liotta L.A., 1974). Allerdings ist es bei nicht erkanntem Primärtumor –abhängig unter anderem von dessen Invasivität und Migrationsfähigkeit- letztlich eine Frage der Zeit bis es zur Entwicklung einer Metastase kommt.

1.3 T-Lymphoma invasion and metastasis Gen 1

1994 gelang Habets und anderen die Entdeckung eines in besonderem Maße Metastasierungsrelevanten Gens. Die Arbeitsgruppe hatte eine retrovirale Insertionsmutagenese durchgeführt und dabei festgestellt, dass die Insertion in einen bestimmten Locus 40% der invasiven Zellklone einer, vor retroviraler Infektion nicht invasiven, T-Zelllymphom-Zelllinie hervorbrachte. Das in diesem Locus kodierte Gen wurde daraufhin „*T-lymphoma invasion and metastasis-Gen 1*“ (*Tiam1*) genannt.

In der Analyse der invasiven Zellklone fanden sich auf RNA-Level nicht nur eine vermehrte Amplifikation des *Tiam1*-Gens sondern auch in hohem Ausmaße Transkripte trunkierter Varianten des Gens (Habets G.G., 1994). Besondere Relevanz unter den trunkierten Varianten erlangte die N-terminal-trunkierte Variante des Tiam1-Genproduktes, die sich aus den 1199 C-terminalen Aminosäuren zusammensetzt und deshalb „C1199-Tiam1“ genannt wird.

Die biochemische Funktion von Tiam1 ist die eines spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktors für die kleine GTPase Rac (Michiels F., 1995). Als Guaninnukleotid-Austauschfaktor hat Tiam1 einen entscheidenden Einfluss auf den Rac-Signalweg und die damit verbundenen Effekte in den Zellen.

Das humane *Tiam1*-Gen wurde auf dem langen Arm von Chromosom 21 lokalisiert und kodiert für 1591 Aminosäuren, die zusammen ein Protein von 177 kDa bilden. Tiam1 ist ein evolutionär hoch konserviertes Protein der Wirbeltierarten und wird in nahezu allen adulten Geweben exprimiert. Außerdem lassen sich Tiam1-Transkripte in nahezu allen Tumorzelllinien –sowohl human als auch murin- nachweisen. (Habets G.G., 1995).

Tiam1 hat den hydrophilen Aufbau eines zytoplasmatischen Proteins (Habets G.G., 1994). Die Genstruktur weist mehrere funktionelle Domänen auf (vgl. Abbildung 3). N-terminal findet sich eine Myristoylierungsstelle, die eine Verankerung in der Zellmembran unterstützen kann. Diese alleine ist allerdings nicht ausreichend für die Translokation an die Zellmembran, wie *in-vitro* Experimente in mehreren Zelllinien gezeigt haben. Für die Translokation sind vielmehr die N-terminale *Pleckstrin-homology-domain* (PH-Domäne) zusammen mit der *coiled-coil*-Region (CC) und der *Extended*-Region (Ex) verantwortlich und eine Deletion nur einer dieser Domänen verhindert die Translokation (Michiels F., 1997).

Weitere N-terminale Domänen stellen die beiden PEST-Sequenzen dar, die bei der Ubiquitinylierung des Proteins eine Rolle spielen. Dem C1199-Tiam1 fehlen diese beiden Domänen, dadurch wird das Protein *in vivo* stabiler als das Volllängenprotein. Die Domänen des N-Terminus regulieren außerdem die Aktivität als Guaninnukleotid-Austauschfaktor. So nimmt bei fehlendem N-Terminus die Austauschfunktion und damit das onkogene Potential zu (Vanni C., 2002).

Die *Tiam1*-Genstruktur enthält weiterhin eine *Ras-binding domain* (RBD) sowie die *postsynaptic density-95/Discs large/Zona occludens-1*-Domäne (PDZ-Domäne) (Mertens A.E., 2003).

Im C-Terminus des Gens liegt die Dbl-homologe (DH)-Domäne. Die DH-Domäne besteht aus drei „konservierten Regionen“ die mit GTP-bindenden Proteinen interagieren, worauf eine Konformationsänderung erfolgt, die eine Dissoziation des hydrolysierten GTPs aus der Nukleotid-Bindungstasche des GTP-bindenden Proteins ermöglicht. Im *Tiam1*-Gen ist die DH-Domäne mit einer PH-Domäne assoziiert. Diese weitere, C-terminale, PH-Domäne kann über die Bindung an Phosphatidylinositole eine Regulation der DH-Domäne vermitteln und ist für die korrekte Funktion der DH-Domäne unerlässlich (Hoffman G.R., 2002).

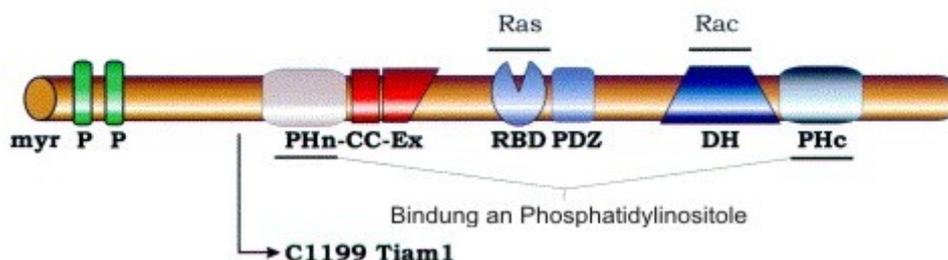


Abbildung 3: Domänen und schematischer Aufbau des Tiam-Gens. Links: N-terminales Ende, es folgen die Domänen: myr = Myristoylierungsstelle, P = PEST-Domänen, PHn = N-terminale Pleckstrin-Homologe-Domäne, CC = Coiled-Coil Region, Ex = extended structure, RBD = Ras-Binde-Domäne, PDZ = PSD-95/DglA/ZO-1-Domäne, DH = Dbl-Homologe Domäne, PHc = C-terminale Pleckstrin-Homologe-Domäne. Außerdem wird gezeigt, welche Domänen C1199 Tiam beinhaltet, sowie dass die RBD mit Ras und die DH-Domäne mit Rac interagiert und dass die PH-Domänen an Phosphoinositole binden. Graphik nach: Mertens A.E., 2003

Eine Translokation von Tiam1 an die Zellmembran ist für die effiziente Aktivierung von Rac von großer Bedeutung. Es konnte anhand mehrerer trunkierter Tiam1-Konstrukte gezeigt werden, dass nur Varianten, für die eine Translokation an die Zellmembran nachweisbar war, in der Lage waren die Rac-vermittelten *membrane-ruffels*, sowie die Aktivierung der c-JUN NH₂-terminalen Kinase (JUN-K) zu vermitteln. So ist die C1199-Tiam1-Aktivität auch des-

halb höher, weil C1199-Tiam1 vor allem an der Zellmembran zu finden ist (Michiels F., 1997).

Die katalytische Domäne von Tiam1 kann an der Zellmembran mit Phospholipiden interagieren, was die Austauschfunktion erhöht (Mertens A.E., 2003). Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die Phosphorylierung von Tiam1 an Threonin-Resten durch die Ca^{2+} / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II. Diese Phosphorylierung kann die Translokation an die Zellmembran unterstützen, sowie die Aktivität der Austauschfunktion verstärken (Mertens A.E., 2003).

Tiam1 kann mit einer großen Anzahl von zytoplasmatischen und Membran-assoziierten Proteinen interagieren. Ein Mechanismus dabei ist die Interaktion mit so genannten *Scaffold*-Proteinen. Es wurde beschrieben, dass die Assoziation von Tiam mit *Scaffold*-Proteinen über die PHn-CC-Ex-Domäne die Signalweg-Spezifität von Rac beeinflussen kann. Dabei kann beispielsweise JIP/IB2, ein *Scaffold*-Protein, selektiv die Rac-Aktivierung des p38 MAP Kinase-Signalwegs verstärken. Spinophilin, ein weiteres *Scaffold*-Protein, kann durch Interaktion mit Tiam1 selektiv die Aktivierung der p70S6-Kinase durch Rac induzieren (Buchsbbaum R.J., 2002; Buchsbbaum R.J., 2003).

Die 70 kDa-ribosomale-S6-Kinase phosphoryliert die S6-Untereinheit des ribosomalen Proteinkomplexes. Ist die S6-Untereinheit phosphoryliert, wird eine spezielle mRNA hergestellt, die für Komponenten der Translationsmaschinerie kodiert und damit die Translationseffektivität beeinflussen kann. Auch konnte in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden, dass eine Überexpression von dominant-negativem Rac1 die Wachstumsfaktor-assoziierte p70S6-Kinaseaktivität beeinflusst (Berven L.A., 2000).

Die Effekte, die durch Tiam1 vermittelt werden, sind unterschiedlich. Die hohe Konservierung des Proteins unter den Wirbeltierarten im Laufe der Evolution impliziert eine generelle Funktion innerhalb zellulärer Signalkaskaden (Habets G.G., 1995).

Diese scheint unter anderem in der Regulation der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und damit in der Beeinflussung der Zellmigration zu liegen. So wird eine hohe Tiam1-Expression beispielsweise im sich entwickelnden Nervensystem gefunden und es wurde gezeigt, dass homozygote *Weaver*-Mäuse, die keine Migration von Granularzellen im Cortex aufweisen auch kein Tiam1 in diesen Zellen exprimieren, während heterozygote Mäuse mit eingeschränkter Migration der Granularzellen eine geringe Expression von Tiam1 in diesen Zellen aufwiesen (Ehler E., 1997).

Die Migrationsfähigkeit von Zellen ist in vielen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der embryonalen Entwicklung oder der Wundheilung unerlässlich.

Kommt es allerdings zu einer anormalen Aktivierung dieser Zellmotilität-beeinflussenden Signalwege im Rahmen einer Tumorerkrankung, kann dies mit einer höheren Metastasierungstendenz des Tumors einhergehen (Minard M.E., 2004).

Es liegen *in-vitro* Studien vor, die in unterschiedlichen Karzinom-Zelllinien eine Überexpression von Tiam1 beschreiben. Auch anhand von immunhistologischen Gewebefärbungen von Tumormaterial lässt sich in einigen Tumoren eine erhöhte Expression von Tiam1 nachweisen. So wurde im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt, dass bei 95% der Prostata-Karzinome eine signifikant höhere Tiam1-Expression vorliegt. Diese fand sich auch bereits in höhergradigen intraepithelialen Neoplasien (Engers R., 2006 a).

Neben den Effekten auf die Zellmigration und Zellinvasion sind auch Tiam1-Effekte auf die Zelladhäsion, unter anderem in *Madin-Darby canine kidney*-Zellen (MDCK), beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Tiam1 in MDCK-Zellen in Zell-Zell-Verbindungen lokalisiert ist und eine Überexpression von Tiam1 die E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte stabilisiert und eine Aktin-Polymerisation an den Zell-Zell-Kontakten vermittelt (Hordijk P.L., 1997).

Tiam1 ist als Guaninnukleotid-Austauschfaktor spezifisch für die kleine GTPase Rac (Michiels F., 1995). Viele der Tiam1-Effekte werden daher über die Aktivierung von Rac vermittelt. Rac gehört zur Familie der Rho-GTPasen, über die hier zunächst ein kleiner Überblick gegeben werden soll.

1.4 Rho-GTPasen

In den frühen 80er Jahren konnte gezeigt werden, dass das Ras-Onkogen in vielen Tumoren unterschiedlicher Gewebe eine Rolle spielt (Weinberg R.A., 1984). Wenig später wurden auch die Rho-Proteine als Untergruppe der Ras-Familie entdeckt. Rho steht dabei für „*Ras-homologous*“. Es handelt sich um kleine GTPasen, die alle etwa 21 kDa groß sind. Sie spielen eine bedeutende Rolle in der Signaltransduktion und verhalten sich dabei wie molekulare Schalter: In ihrer aktiven Form sind sie GTP beladen und können untergeordnete Signalwege aktivieren. Die GTPase-Aktivität des Proteins selbst ist für die Inaktivierung verantwortlich: Es wird ein Phosphat abgespalten, so dass ein GDP-gebundene, inaktive Form entsteht. Um die GTPase erneut zu aktivieren, ist zunächst eine Dissoziation des GDP notwendig. Es kann dann erneut GTP gebunden werden. Die Bindung von GTP führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, die die Bindungaffinität an die Effektorproteine stark erhöht (Löffler G., 2003 b). Für diese Konformationsänderung von GTP-gebundenem zu GDP-gebundenem Rac sind vor allem zwei Regionen verantwortlich, die Switch I und Switch II genannt werden (Wennerberg K., 2004).

Man unterscheidet drei Klassen regulatorischer Proteine, die auf die Aktivität der kleinen GTPasen entscheidenden Einfluss haben: Die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysieren die Dissoziation des GDPs und die daraufhin folgende Bindung eines neuen GTPs. Die zweite Klasse, die Guaninnukleotid-Aktivierungsfaktoren (GAFs) fungieren als Hilfsfaktoren der sonst eher geringen intrinsischen GTPase-Aktivität. Sie sorgen für die schnelle Inaktivierung. Die dritte Gruppe regulatorischer Proteine sind die Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs). Diese GDIs können mit den aktiven GTPasen interagieren und so die Signaltransduktion unterbrechen. Außerdem besteht noch ein weiterer Mechanismus: GDP-gebundene, also inaktive GTPasen befinden sich hauptsächlich im Zytoplasma. Dort liegen sie im Komplex mit GDIs vor. Diese blockieren die C-terminale CAAX-Box, die für die posttranslationale Modifikation wichtig ist. In dieser Modifikation bekommen die kleinen GTPasen einen Fettsäure-Anker, der die Translokation an die Zellmembran ermöglicht. Erst hier können die GTPasen durch GEFs aktiviert werden (Robbe K., 2003; Ellenbroek S.I., 2007).

In den frühen neunziger Jahren wurde in *Swiss 3T3*-Zellen gezeigt, dass die Familie Rho-ähnlicher GTPasen, nach Wachstumsfaktor-Stimulation das Aktin-Zytoskelett regulieren (Ridley A.J., 1992 a). Dabei führte eine Mikroinjektion von Rac1 in die Zellen zur Induktion der so genannten *membrane-ruffles* und zu der Formierung von Lamellipodien (Ridley A. J., 1992 b). Aktives Rac induziert in dem Bereich der Zellperipherie, von dem das Lamellipodium ausgeht, die Aktin-Polymerisation und die Ausbildung der Integrin-Adhäsionskomplexe zur Interaktion mit der extrazellulären Matrix (Ridley, 2001).

Die Rho-GTPasen sind außerdem in viele weitere Signaltransduktionswege eingebunden und beeinflussen sich in hohem Maße untereinander (Etienne-Manneville S., 2002).

1.5 Rac3

1997 wurde die kleine GTPase Rac3 entdeckt. Die Aminosäuresequenz von Rac3 ist dabei zu 92 % identisch mit der von Rac1 und zu 89 % mit der von Rac 2. Die kodierende DNA für Rac3 konnte auf Chromosom 17 q23-25 lokalisiert werden und kodiert für ein Protein mit 192 Aminosäuren (Haataja L., 1997). Mit Hilfe von Northern Blots aus menschlichen Geweben konnte nachgewiesen werden, dass die höchsten Expressionslevel von Rac3 vor allem im Gehirn, aber auch in Herz, Plazenta und Pankreas zu finden sind (Haataja L., 1997). Anschließend wurde gezeigt, dass auch Rac3 GTPase-Aktivität besitzt und sich die Rac3-Hydrolyserate nicht von Rac1 unterscheidet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass konstitutiv aktives Rac3 in COS 1-Zellen den c-JUN NH₂-terminalen Kinase-Signalweg aktiviert (Haataja L., 1997).

Im Aufbau der drei Rac-Proteine gibt es nur geringe Unterschiede. Der N-terminale Bereich ist bei allen drei Rac-Proteinen identisch, während der C-terminale Bereich von Rac3 zu 94 % identisch mit dem von Rac1 und zu 91 % identisch mit dem von Rac 2 ist (Haataja L., 1997). Der C-terminale Bereich wird durch eine CAAX-Box und eine variable, polybasische Sequenz gebildet (Wennerberg K., 2004). Der Cystein-Rest der CAAX-Box kann methyliert und mit Fettsäureresten versehen als Membrananker dienen (Löffler G., 2003 c). Es gelang zu zeigen, dass in der murinen N1E-115-Neuroblastom-Zelllinie eine Überexpression von entweder Rac1 oder Rac3 unterschiedliche Phänotypen hervorbringt. So zeigten sich die Rac3-überexprimierenden Zellen klein und rund mit einer Tendenz zur Clusterbildung und nur schlechter Adhäsion an Plastik (Hajdo-Milasinovic A., 2007). In Versuchen mit mehreren

Mutanten bezüglich des C-Terminus konnte anschließend gezeigt werden, dass der kleine Bereich der Aminosäuren 185-187 der polybasischen Sequenz diesen Unterschied im Zellphänotyp bedingen kann und dass dieser über eine unterschiedliche Lokalisation innerhalb der Zelle vermittelt wird. So wurde gezeigt, dass Rac3 vorwiegend in der perinukleären Region lokalisiert ist, während Rac1 eher an der Zellmembran und in Zellfortsätzen nachzuweisen war (Hajdo-Milasinovic A., 2007).

Ten Klooster und andere formulierten die Hypothese, dass die polybasische, variable Region zusammen mit dem Lipidanker die einzelnen Rac-Isoformen an bestimmte Membranen assoziiert, an denen dann eine lokale GTPase-Aktivität auftritt. Durch diese lokalisierte GTPase-Aktivität sollen nur die Effektorproteine aktiviert werden, die sich in der Nähe der jeweiligen Membran befinden (ten Klooster J.P., 2007).

Der N-terminale Bereich ist, mit den Effektor-Bindungsdomänen und den Switch I und II-Regionen, bei Rac1 und Rac3 identisch. Deshalb ist es nicht weiter verwunderlich, dass die seit langem bekannten Effektoren von Rac1, wie die p21 aktivierte Kinase, die c-JUN NH₂-terminale Kinase und die Phospholipase C β auch von konstitutiv aktivem Rac3 aktiviert werden können. Es wurden weitere Kinasen, Rho-GDIs und GEFs, darunter auch Tiam1, auf ihre Bindungsfähigkeit an beide Rac-Isoformen getestet, mit dem Ergebnis, dass die Mehrheit der Proteine gleich gut an Rac1 und 3 bindet (Hajdo-Milasinovic A., 2007).

Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Signalwege downstream von Rac1 zumindest theoretisch ebenfalls durch Rac3 aktiviert werden können. Von Rac1 weiß man, dass es konstitutiv aktiv auch den Stress-aktivierten Signalweg der p38 MAP Kinase regulieren und ERK aktivieren kann. Die ERK-Aktivierung geschieht dabei entweder direkt oder über die Mitogen-aktivierten Proteinkinasekaskaden (Mira J.P., 2000).

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalwege sind in allen eukaryontischen Zellen von hoher Relevanz. Sie können über verschiedenste Stimuli und Rezeptoren aktiviert werden und koordinieren eine Vielzahl von zellulären Funktionen wie Genexpression, Zellzyklus, Apoptose und Zelldifferenzierung. Bis heute sind verschiedene Gruppen der MAP-Kinasen charakterisiert. Dazu gehören unter anderem die oben erwähnten extrazellulär regulierten Kinasen (ERK), die c-JUN NH₂-terminalen Kinasen (JNK), und die p38 Kinasen. Von allen MAP-Kinasen gibt es unterschiedliche Spleißvarianten (Krishna M., 2008).

Auch der NF κ B-Signalweg kann von Rac, unabhängig von Ras, beeinflusst werden (Perona R., 1997). NF κ B, ist ein Transkriptionsfaktor, der normalerweise im Zytoplasma als Komplex mit seinem aus mehreren Untereinheiten bestehendem Inhibitorprotein I κ B vorliegt. Durch

verschiedene extrazelluläre Stimuli kann eine Phosphorylierung von I κ B mit anschließender Ubiquitinylierung und proteolytischem Abbau erfolgen (Löffler G., 2003 d). Rac kann dabei unter anderem die Aktivität der I κ B-Kinase stimulieren (Cammarano M.S., 2001). Im Folgenden liegt NF κ B nicht länger inhibiert im Zytoplasma vor, kann in den Zellkern transportiert werden und so die Gentranskription beeinflussen. Als Transkriptionsfaktor reguliert NF κ B Gene, die mit Immunantwort und Entzündungsreaktionen im Zusammenhang stehen. Außerdem werden anti-apoptotische Gene und Gene der Zellzykluskontrolle wie Cyclin D1 kontrolliert (Cammarano M.S., 2001).

Cyclin D1 vermittelt seine Funktionen über Cyclin-abhängige Kinasen (CDK), Histonacetylasen sowie Histondeacetylasen und moduliert so die Chromatinstruktur von Genen, die in Zusammenhang mit Zellproliferation und Zelldifferenzierung stehen. Zudem ist Cyclin D1 als regulatorische Untereinheit an der Phosphorylierung und damit der Inaktivierung des Zellzyklus-inhibierenden Retinoblastomproteins beteiligt (Fu M., 2004).

Auch der Akt-Signalweg kann durch Rac stimuliert werden. Dies geschieht in erster Linie über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Rygiel T.P., 2008). Akt wurde 1993 erstmals als ein Onkogen beschrieben (Ahmed N.N., 1993). Die Serin-Threonin-Kinase ist Bestandteil von Wachstumsfaktor-assoziierten Signalkaskaden. Die Akt1-Kinaseaktivität ist in Prostatakarzinomen oft erhöht und dann mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Sun M., 2001). Eine Steigerung der ROS innerhalb der Zelle ist in viele Signalvermittlungsprozesse des Tiam1/Rac-Signalwegs eingebunden. Grundlage dafür ist der folgende Mechanismus: Reaktive Sauerstoffspezies können über mehrere Wege intrazellulär generiert werden. Die ROS, die am Transduktionsgeschehen beteiligt sind, werden aber zu einem Großteil von den Plasmamembran-Oxidasen, vor allem den NADPH-Oxidasen produziert. Rac GTPasen tragen zur Aktivierung der NADPH-Oxidasen Nox 1 bis 3 bei und bestimmen so in großem Maße die intrazelluläre ROS-Produktion (Sauer H., 2001).

Für Rac1 sind mehrere Effektordomäne-Mutanten beschrieben. Diese wurden auch für Rac3 etabliert (Keller P.J., 2005). Dabei zeigten sich Unterschiede beispielsweise dahingehend, dass die F37L-Effektordomäne-Mutante von Rac3 im Gegensatz zu der Rac1-Mutante zu einem vermehrten *Membrane-ruffling* führte. Dies könnte darauf hinweisen, dass Rac1 und Rac3 möglicherweise über verschiedene Signalwege die Modulation des Aktinzytoskeletts vermitteln (Keller P.J., 2005).

Da, wie oben beschrieben, die Effektor-Bindungsdomänen und die Switch I und II-Regionen von Rac1 und Rac3 identisch sind, kommen für unterschiedliche Effekte beider Proteine, vor

allem jene Proteine in Frage, die außerhalb der Kern-Domänen an Rac-Proteine binden. Dies ist unter anderem für die NADPH-Oxidasen beschrieben (Freeman J.L., 1996).

Die physiologische Relevanz der Rac3 Expression scheint vor allem in der Entwicklung des Nervensystems höherer Wirbeltiere zu liegen. Besonders in der späten Hirnentwicklungsphase, in der eine intensive Neuronenverzweigung und die Synapsenbildung auftreten, wird Rac3 stark exprimiert und reguliert (Corbetta S., 2009). Allerdings lässt sich eine Überexpression von Rac3 auch mit Tumorstadium und Invasivität in Verbindung bringen. So wurde bereits 1999 von Mira et al. ein Zusammenhang zwischen konstitutiv aktivem Rac3 und einer verstärkten Proliferation von Brustkrebszelllinien entdeckt. In weiteren Experimenten konnte die Gruppe zeigen, dass in einer von drei Gewebeproben von Brustkrebsmetastasen aktives Rac3 zu finden war (Mira J.P., 2000). Ähnliches zeigte sich auch in den Vorarbeiten zu dieser Arbeit: Beim Prostatakarzinom und dessen Vorstufen sowie in der hochgradigen, prostatichen intraepithelialen Neoplasie war die Expression von Rac, verglichen mit dem normalem sekretorischen Epithel der Prostata, signifikant erhöht. Diese Erhöhung konnte vor allem einer verstärkten Expression der Rac3-Isoform zugeordnet werden (Engers R., 2007). Eine Versuchsreihe von Chan und anderen, die mit Hilfe von small interfering RNA direkt Rac1- oder Rac3-RNA inhibierten, zeigte für Glioblastom- und Brustkrebszelllinien, dass Rac3 vor allem auch die Invasivität der Zellen beeinflusst (Chan A.Y., 2005).

Untersuchungen zur funktionellen Relevanz von Rac3 im Prostatakarzinom wurden bislang jedoch nicht durchgeführt.

1.6 Fragestellung

In den Vorarbeiten dieser Arbeit gelang es, nachzuweisen, dass die Expression des metastasierungsrelevanten Gens Tiam1 sowohl in der hochgradigen, prostatistischen intraepithelialen Neoplasie als auch in Prostatakarzinomgewebe signifikant gesteigert war.

In multivarianten Analysen, die die typischen Prognosefaktoren des Prostatakarzinoms einschlossen, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine starke Überexpression von Tiam1 als unabhängiger Prognosefaktor für ein Rezidiv gewertet werden kann (Engers R., 2006 a).

Da Tiam1 ein spezifischer Guaninnukleotidaustauschfaktor der kleinen GTPase Rac ist, wurde auch die Expression von Rac untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von Rac in Prostatakarzinomen und in der hochgradigen, prostatistischen intraepithelialen Neoplasie gegenüber dem normalen sekretorischen Prostataepithel. Diese Erhöhung war vor allem durch eine erhöhte Expression der Rac3-Isoform bedingt (Engers R., 2007).

Es stellt sich die Frage, welche funktionelle Relevanz die erhöhte Expression von Tiam1 und Rac3 in Prostatakarzinomen besitzt. Dies soll *in-vitro* durch stabile Transfektion und Expression der Wildtypen und konstitutiv-aktiven Tiam1 und Rac3- Konstrukte in der hormonresistenten Prostatakarzinomzelllinie PC3 untersucht werden.

Im Rahmen der Untersuchungen des Tiam1/Rac1-Signalwegs anhand der Nierenzellkarzinom-Zelllinie clearCa28 wurde ein Mechanismus beschrieben, über den der Tiam1/Rac1-Signalweg zu einer Invasionshemmung führen kann. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Hochregulation von TIMP1 und TIMP2 kommt, während die Menge der MMPs gleich bleibt. Dies führt zu einer Hemmung der Invasion in den funktionellen Assays (Engers R., 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll daher untersucht werden, ob sich auch in der Prostatakarzinomzelllinie PC3 eine Beeinflussung von TIMPs oder MMPs durch den Tiam1/Rac1 bzw. Rac3-Signalweg zeigt.

Zusätzlich soll anhand des Nachweises von Phosphorylierungen, der für Rac1 beschriebenen *downstream*-Effektor-Signalproteine untersucht werden, welche der Signalwege *downstream* von Rac3 in der Prostatakarzinomzelllinie PC3 aktiviert werden.

Konkret sollen im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen untersucht werden:

Welche funktionelle Relevanz hat der Tiam1/Rac3-Signalweg in Bezug auf Zelladhäsion, Proliferation, Migration und Invasion des Prostatakarzinoms?

Welche funktionelle Relevanz hat der Tiam1/Rac3-Signalweg in Bezug auf die Sekretion von Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren, den *Tissue inhibitors of metalloproteinases*?

Welche Signalmoleküle *downstream* von Rac1 sind auch in den Tiam1/Rac3-Signalweg eingebunden?

2 Material

2.1 Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav	Systec (Wettenberg)
Bakterienbrutschrank	Memmert (Schwabach)
Brutschrank	Forma scientific (Marietta,USA)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Brutschrank	Labotect (Göttingen)
Elektrophoresekammer	Hoefer (San Francisco, USA)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Geltrockner 583	Bio Rad (München)
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Inkubationsroller RM5	CAT Zipperer GmbH (Staufen)
Inkubationsschüttler Certomat HK	B.Braun (Melsungen)
Inkubationsschüttler 3033	GFL (Burgwedel)
Konfokalmikroskop	Zeiss (Jena)
Kühlschrank +4°C	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühlschrank -20°C Comfort NoFrost	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühlschrank -80°C	Thermo fisher scientific (Waltham, USA)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph (Schwabach)
Microplate Reader 680	Bio Rad (München)
Mikroskop Labovert FS	Leitz/Leica (Wetzlar)
Mikroskopkamera DFC 320	Leica (Wetzlar)
Mikrowelle Micromat	AEG (Nürnberg)
Netzgerät	Bio Rad (München)
pH-Meter Φ340pH/Tempmeter	Beckman (Krefeld)
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf (Hamburg)
Spektralphotometer	Eppendorf (Hamburg)
Sterilbank Typ DLF/BSS6	J. H. Schrader (Göttingen)
Sterilbank Typ BSB4	Gelaire Flow Laboratories (Opera, Italien)
Tischautoklav Typ 26	Melag (Berlin)
Ultraschallgerät Sonifier	Bandelin electronics (Berlin)
Vakuumpumpe	Bio Rad (München)

Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Wasserbad	Fisher & Rintelen GmbH (Essen)
Western Blot Anlage	Hoefer (San Franzisko, USA)
Zentrifuge Biofuge 13 R	Hereaus Instruments (Hanau)
Zentrifuge Megafuge 1,0 R	Heraeus Sepatech (Osterode)
Zentrifuge Mikro 20	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

Tabelle 2: Laborgeräte

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Amicon Ultra 15 Centrifugal Filter Devices	Milipore (Bedford, USA)
Deckgläser	Menzel Gläser (Hamburg)
Eppendorfreaktionsgefäße (0,5-2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Falcon Tubes	Greiner (Frickenhausen)
Halbmikroküvetten UVette	Eppendorf (Hamburg)
Nitrozellulosemembran	Pall-Gelman Laboratory (Dreieich)
Objekträger	Metzel Gläser (Braunschweig)
Parafilm	American National Can TM (Chicago, USA)
Pipettenspitzen	StarLab (Ahrensburg)
Plastikküvetten	Sarstedt (Nürnbrecht)
Plastikpipetten	Corning (New York, USA)
Röntgenfilm Medical X-ray	Fuji-Film Europe (Düsseldorf)
Transwell Thin Cert 8 µm	Greiner (Frickenhausen)
Whatman Papier	Whatman GmbH (Dassel)
Zellkulturflaschen	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturplatten 96-well, 24-well, 6-well	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellkultur Schalen	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellschaber	TPP (Trasadingen, Schweiz)

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

2.3 Chemikalien und gekaufte Lösungen

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

Alle anderen Chemikalien oder Chemikalien, die über die Reinsubstanz hinausgehen, sowie gekaufte Lösungen finden sich in der nachfolgenden Tabelle.

Name	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese 30 Gel	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
Aqua dest.	Delta Select (Pfullingen)
Bradford-Reagenz	Bio Rad (München)
Bovine Serum Albumin pH= 7,0	PAA Laboratories (Pasching)
Complete Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim)
Entwickler Eukobrom	Tetenal (Norderstedt)
Eosin	Sigma (Deisenhofen)
Eukitt	Kindler (Freiburg)
Fibronektin	Sigma (Deisenhofen)
Fixierer Superfix Plus	Tetenal (Norderstedt)
Laminin Ultrapure Mouse	BD Bioscience (San Jose, USA)
Matrigel Matrix Phenolrotfrei	BD Bioscience (San Jose, USA)
Phenazine-Methyl-Sulfat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma (Deisenhofen)
Ponceau Lösung	Sigma (Deisenhofen)
Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas (St. Leon-Rot)
TEMED	Bio Rad (München)
Triton X 100	Biomol (Hamburg)
Trypanblau	Sigma (Deisenhofen)
Vectashield	Vector Laboratories (Eching)
XTT	Biomol (Hamburg)
Xylol	Roth (Karlsruhe)

Tabelle 4: Chemikalien

2.4 Puffer und Lösungen

Lysispuffer

Lysispuffer für Western Blots	150 mM NaCl 50 mM Tris pH 7,5 5 mM EDTA 1% NP 40
Lysispuffer für Phospho Blots	20 mM Tris pH 7,5 0,27 M Saccharose 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM Natrium-Orthovanadat 10 mM Natrium-β-Glycerolphosphat 50 mM Natrium-Fluorid 5 mM Natrium-Pyrophosphat 1% w/v Triton X 100

Tabelle 5: Lysispuffer

Western-Blot-Lösungen

2 x SDS Gel-Ladepuffer	0,1 M Tris-HCl pH 6,8 0,2 M DTT 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerol eine Spatelspitze Bromphenolblau
6x Ladepuffer	60 % (v/v) Glycerol 300 mM Tris pH6,8 12 mM EDTA 12 % (w/v) SDS 864 mM β-Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau (eine Spatelspitze)
10x Elektrophoresepuffer	0,25 M Tris 2 M Glycerin 10 % (w/v) SDS
Transferpuffer	25 mM Tris

	0,2 M Glycin 20 % (v/v) Methanol	
Waschpuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 0,2 % Tween 20 0,15 M NaCl	
ECL-Lösung	Lösung A	0,1 M Tris pH 8,6 2,5 mM Luminol in DMSO
	Lösung B	6,7 mM p-Coumarinsäure in DMSO
	Lösung C	3 % H ₂ O ₂

Tabelle 6: Western-Blot-Lösungen

Zusammensetzung der Trenngele

Acrylamidanteil	6 %	8 %	10 %	12 %
Komponenten	Volumen			
Wasser	5,3 ml	4,6 ml	4 ml	3,3 ml
Acrylamid (30%-ig)	2 ml	2,7 ml	3,3 ml	4 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 7: Zusammensetzung der Trenngele

Zusammensetzung des Sammelgels

Acrylamidanteil	5%
Komponenten	Volumen
Wasser	3,4 ml
Acrylamid (30%-ig)	830 µl
1M Tris-HCl pH 6,8	630 µl
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tabelle 8: Zusammensetzung des Sammelgels

Zellkulturlösungen

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

Tabelle 9: Zellkulturlösungen

Lösungen Adhäsionsassay

Laminin-Lösung	10 µg/ml Laminin in PBS
Blockierungslösung	3% BSA in PBS

Tabelle 10: Lösungen Adhäsionsassay

Zymographie-Lösungen

Färbelösung	30 % Methanol 10 % Eisessig 60 % Wasser 0,25 % Coomassie Blau
Entfärbelösung	30 % Methanol 10 % Eisessig 60 % Wasser
Waschlösung	2,5 % Triton X100 in Wasser
Reaktionspuffer	0,05 M Tris-HCl pH 7,5 0,02 M NaCl 5 mM CaCl ₂ 0,02 % Brij-35
Ladepuffer	25% 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 40% SDS 10% 20% Glycerol Bromphenolblau einige Körnchen 15% H ₂ O
Gelatine-Lösung	1% Gelatinepulver in Aqua dest.

Tabelle 11: Zymographie-Lösungen

Lösungen Migrationsassay

Fibronectin-Lösung	10 µg/ml Fibronectin in PBS
--------------------	-----------------------------

Tabelle 12: Lösungen Migrationsassay

Lösungen Invasionsassay

Matrigel-Lösung	250 µg/ml Matrigel in H ₂ O
-----------------	----------------------------------------

Tabelle 13: Lösungen Invasionsassay

Lösungen Proliferationsassay

XTT-Lösung	0,1 g/ml XTT in H ₂ O
PMS-Lösung	1,5 mg/ml PMS in H ₂ O

Tabelle 14: Lösungen Proliferationsassay

Lösungen Phospho Blots

TBS-T mit Zusätzen	0,2 % (v/v) Tween20 0,01 M Tris pH 7,5 0,15 M NaCl 200 µM Natrium-Orthovanadat 50 mM Natrium-Fluorid 2 mM EDTA
Stripping-Puffer	0,2 M Glycin 0,5 M NaCl pH= 2,8 (w/HCl)

Tabelle 15: Lösungen Phospho Blots

Lösungen Immunfluoreszenz

Fixierlösung	3,7% Formaldehyd in PBS
Permeabilisierungslösung	0,5% Triton X in PBS
Blockierungslösung	1% BSA in PBS
Dapi-Lösung	5µg/ml Dapi in PBS

Tabelle 16: Lösungen Immunfluoreszenz

Nährmedien Bakterienkultur

LB-Flüssigmedium	10 g NaCl 5 g Hefeextrakt, 10 g Bacto-Trypton auf 1000ml H ₂ O, pH 7,4
LB-Amp-Agar-Platten	10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Bacto-Trypton 10 g Bacto-Agar auf 1000 ml H ₂ O 50 µg/ml Ampicillin

Tabelle 17: Lösungen Bakterienkultur

2.5 Reagenziensets („Kits“)

Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)

Tabelle 18: Reagenziensets

2.6 Antikörper

Antikörper Expressionsnachweis

Erstantikörper	Organismus	Hersteller	Verdünnung	Blockierungslsg.
Anti-C16-Tiam1	Kaninchen	Santa Cruz	1:500	1% BSA 3% Milchpulver
Anti-Rac1	Maus	Santa Cruz	1:1000	1% BSA 3% Milchpulver
Anti-FLAG	Maus	Sigma	1: 500	1% BSA 3% Milchpulver
Anti-Tubulin	Maus	Sigma	1:3000	1% BSA 3% Milchpulver
Anti-Cyclin D1	Maus	Santa Cruz	1 :200	1%BSA 3%Milchpulver
Anti-NFκB	Kaninchen	Santa Cruz	1:500	1% BSA 3%Milchpulver

Tabelle 19: Primärantikörper Expressionsnachweis

Antikörper Phospho Blots

Erstantikörper	Organismus	Hersteller	Verdünnung	Blockierungslsg.
Anti-phospho-Akt	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
Anti-phospho-p38 MAP-Kinase	Kaninchen	Cell Signaling	1:500	5% Milchpulver
Anti-phospho-JUN- Kinase	Kaninchen	Cell Signaling	1:200	5% BSA
Anti-phospho-p70S6- Kinase	Maus	Santa Cruz	1:500	1% BSA 3% Milchpulver
Anti-phospho-ERK	Maus	Santa Cruz	1:500	5% BSA
Anti-Akt	Maus	Cell Signaling	1:1000	5% Milchpulver
Anti-p38 MAP-Kinase	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
Anti-JUN-Kinase	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
Anti-p70S6-Kinase	Maus	Santa Cruz	1:1000	1%BSA 3%Milchpulver
Anti-ERK1	Kaninchen	Santa Cruz	1:1000	3%BSA

Tabelle 20: Primärantikörper Phospho Blots

Sekundärantikörper

Zweitantikörper	Organismus	Hersteller	Verdünnung	Blockierungslsg.
Anti-Maus-HRP	Schaf	Sigma	1:3000	1% BSA 3% Milchpulver
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	Sigma	1:3000	1% BSA 3% Milchpulver

Tabelle 21: Sekundärantikörper

Antikörper Immunfluoreszenz

Erstantikörper	Organismus	Hersteller	Verdünnung	Blockierungslsg.
Anti-E-Cadherin	Maus	Novacastra	1:25	1% BSA in PBS
Anti- β -Catenin	Kaninchen	Sigma	1:50	1% BSA in PBS

Tabelle 22: Primärantikörper Immunfluoreszenz

Zweitantikörper	Organismus	Hersteller	Verdünnung	Blockierungslsg.
FITC-anti-Maus	Ziege	Zymed Laboratories	1:60	1% BSA in PBS
FITC-anti-Kaninchen	Ziege	Zymed Laboratories	1:60	1% BSA in PBS

Tabelle 23: Sekundärantikörper Immunfluoreszenz

2.7 Zellen**Zelllinie**

Zelllinie	Organ	Herkunft	Medium	Antibiotika
PC3	Prostata	Knochenmetastase	RPMI	Pen./ Strep.

Tabelle 24: Zelllinie

Kompetente E. coli- Zellen

Escherichia coli DH5 α	Gibco BRL (Gaithersburg, USA)
-------------------------------	-------------------------------

Tabelle 25: Kompetente Zellen

2.8 Medien, Antibiotika, Zusätze und Lösungen der Zellkultur

Blasticidin S HCl	Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline	Sigma (Deisenhofen)
EDTA 1% w/v in PBS	Biochrom AG (Berlin)
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco BRL (Paisley, USA)
L-Glutamin	Gibco BRL (Paisley, USA)
Optimem	Gibco BRL (Paisley, USA)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL (Paisley, USA)
RPMI 1640	Gibco BRL (Paisley, USA)
Trypsin 10x Lösung	Sigma (Deisenhofen)

Tabelle 26: Medien, Antibiotika, Zusätze und Lösungen für die Zellkultur

2.9 Konstrukte

Name	Insert	Plasmid
Mock		p LZRS-IRES
Volllängen-Tiam1	Fl-Tiam1	p LZRS-IRES
C1199-Tiam1	C1199-Tiam1	p LZRS-IRES
Wildtyp-Rac3	Rac3-wt	p LZRS-IRES
V12-Rac3	V12-Rac3	p LZRS-IRES

Tabelle 27: Konstrukte

Das pLZRS-IRES-Plasmid sowie das bereits in dieses Plasmid klonierte Volllängen-Tiam1 erhielten wir freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe von Herr Dr. John Collard vom Netherlands Cancer Institut.

2.10 Software

Für die statische Auswertung der Ergebnisse wurde die Software SPSS 14.0 (SPSS Inc., (IBM)) verwendet.

Die Graphiken wurden in der Software CorelDRAW Graphics Suite X4 (Corel Corporation) erstellt bzw. bearbeitet.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die PC3-Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert.

Das Wachstum der Zellkultur wurde mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops kontrolliert. Ab einer Konfluenz des Zellrasens von bis zu 80 %, wurden die Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt, um die Zellkultur stets in ihrer logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Dazu wurde das verbrauchte Zellkulturmedium verworfen und der Zellrasen in der Zellkulturflasche mit PBS gespült, um verbliebene Mediumreste zu entfernen. Das PBS wurde sofort wieder abpipettiert und es wurde kurzzeitig Trypsin / EDTA-Lösung auf den Zellrasen gegeben, um die Zellen enzymatisch voneinander und vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Der Vorgang wurde mit Hilfe des Mikroskops kontrolliert und die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von frischem Medium beendet. Die Zellen wurden anschließend für die nächste Passage in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät und ausreichend frisches Medium hinzugegeben. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen entweder erneut geteilt oder nur das Medium erneuert.

Die Zellen in der laufenden Zellkultur wurden in regelmäßigen Abständen mittels Mykoplasmen-PCR auf eine Mykoplasmen-Infektion untersucht. So wurde sichergestellt, dass alle Ergebnisse mit Mykoplasmen-freien Zellen zustande gekommen sind.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Um mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl zu bestimmen, wurde zunächst ein Aliquot der trypsinierten und in Medium suspendierten Zellen genommen. Die Zählkammer wurde gereinigt und das Deckglas angefeuchtet und aufgeschoben, bis „Newton-Ringe“ zu sehen waren, die anzeigen, dass die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt ist. Die Zellsuspension wurde dann im Verhältnis 1:2 oder 1:4 mit Trypanblau gemischt und in die Zählkammer überführt. Das Verhältnis der Verdünnung mit Trypanblau ergab sich durch die

Zellzahl. Bei hoher Zellzahl wurde 1:4 verdünnt, so dass sich nie unter 20 oder über 100 Zellen in einem Großquadrat der Zählkammer befanden. Unter dem Mikroskop wurde zunächst verglichen, ob die Zellzahl in den Großquadraten ungefähr übereinstimmte. Dann wurden die Zellen in vier Großquadraten der Kammer gezählt (Abbildung 4). Dabei wurden die apoptotischen -durch Trypanblau angefärbten- Zellen nicht mitgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension ergab sich durch Multiplikation des Mittelwertes der vier Großquadrate mit 10^4 (bei $0,1 \mu\text{l}$ Volumen eines Großquadrates) und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension.

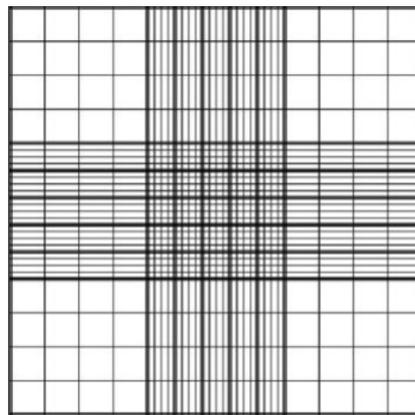


Abbildung 4: Aufbau der Neubauer-Zählkammer. In den Ecken befinden sich die vier Großquadrate, die aus 16 Kleinquadraten aufgebaut sind. Ein Großquadrat hat eine Kantenlänge von 1 mm^2 und eine Tiefe von $0,1 \text{ mm}$.
Graphik: LO Laboroptik GmbH, 2002

3.1.3 Isolation von Proteinen aus Zellen

Um die Proteinexpression der Zellen nachzuweisen, mussten diese zunächst lysiert werden. Dazu wurden die Zellen aus einer konfluenten Zellkulturflasche durch Zugabe von Trypsin / EDTA-Lösung gelöst. Anschließend wurde die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von Medium beendet und durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min ein Zellpellet gewonnen. Das überstehende Medium wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und erneut durch Zentrifugation pelletiert. Der gekühlte Zell-Lysis-Puffer wurde im Verhältnis 1:9 mit Proteinase-Inhibitor versetzt und auf das Zellpellet gegeben. Die Menge des Lysispuffers richtete sich dabei nach der Größe des Zellpellets. Zur Zelllyse wurden die Proben mindestens 20 Minuten auf Eis inkubiert. Zur besseren Konservierung der Proteine wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit den Lysaten auch danach durchweg auf Eis gehalten. Nach der Lyse

wurden die Lysate zusätzlich sonifiziert, um auch die nukleären Proteine freizusetzen. Es folgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C für 10 Minuten, bei der sich der Zelldetritus am Boden des Reaktionsgefäßes absetzte. Die Lysate wurden dann in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

3.1.4 Transfektion

Um die Plasmid-Konstrukte stabil in die PC3 Zellen zu integrieren, wurde das SuperFect® Transfektionsreagenz nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip hierbei ist eine Komplexbildung des SuperFect®-Reagenz mit der DNA. Dieser Komplex ist durch die polykationischen SuperFect-Moleküle positiv geladen und kann sich so an negativ-geladene Zellrezeptoren anlagern, welche die Endozytose in die Zelle vermitteln. Die für die Transfektion verwendete DNA wurde mit dem QiaFilter®-Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers präpariert. Am Vorabend der Transfektion wurden 300.000 Zellen in einer 60 mm-Zellkultur-Schale ausgesät und über Nacht im CO₂-Inkubator inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde das Volumen, welches 5 µg DNA entsprach, aus der Maxi-Präp entnommen und auf 150 µl mit Optimem-Medium verdünnt. Der Ansatz wurde gemixt und kurz zentrifugiert. Dann wurden 25 µl SuperFect®-Reagenz hinzugefügt, auf- und abpipettiert und der Ansatz fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden die am Vorabend ausgesäten Zellen mit PBS gewaschen. Nach Inkubation wurde dem SuperFect®-DNA-Komplex 1 ml Vollmedium ohne Antibiotika zugefügt. Dann wurde der Ansatz gemischt und auf die Zellen in der 60 mm-Zellkultur-Schale gegeben. Die Zellen wurden für 2 bis 3 Stunden mit der Komplex-Lösung im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Komplex-Lösung abpipettiert, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und frisches RPMI-Medium mit allen Zusätzen hinzugegeben.

3.1.5 Selektion der Zellen

Das LZRS-Plasmid enthält ein Blastocidin-Resistenzgen. Somit konnte die Selektion der transfizierten Zellen über deren Blastocidin-Resistenz erfolgen. Dazu wurde dem Vollmedium 5 µg/ml Blastocidin hinzugesetzt. Untransfizierte PC3-Zellen dienen zur Erfolgskontrolle der Selektion. Auch in der weiteren Zellkultur -nach erfolgreicher Transfektion- wurde dem

Vollmedium stets Blastocidin hinzugefügt, um ein kontinuierliches Umsetzen der Plasmid-kodierten Konstrukte zu gewährleisten.

3.1.6 Adhäsionsassay

Zur Vorbereitung des Versuchs wurden auf den Boden von 3,5 cm durchmessenden Zellkulturschalen je vier Lochverstärkungsringe geklebt. In das Innere der Ringe wurden je fünf parallele Linien gezeichnet. Sie dienen der besseren Orientierung beim späteren Zählen. Pro Konstrukt wurden je drei Zellkulturschalen verwendet. Diese wurden über 24h bei 4°C mit einer Laminin-Lösung beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Laminin-Lösung verworfen und die Zellkulturschalen zweimal mit PBS gespült. Dann erfolgte eine weitere Inkubation über Nacht bei 4°C in 3%-iger BSA-Lösung, zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Vor dem Versuch wurde die Lösung abpipettiert, RPMI-Zellkulturmedium in die Zellkulturschalen gegeben und die Schalen bei 37° C im Inkubator vorgewärmt, um möglichst gute Bedingungen für die adhärierenden Zellen zu schaffen.

Um eine gleiche Behandlung und gleiche Zeiträume zu garantieren, wurde der Versuch mit nur jeweils einem Konstrukt, also drei Zellkulturschalen gleichzeitig, durchgeführt. Die PC3-Zellen für den Versuch wurden in Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von etwa 70 % kultiviert und für den Versuch mit Hilfe von Trypsin / EDTA-Lösung gelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde mit Medium beendet und die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss daran wurde die Zellzahl bestimmt (vgl. 3.1.2.) und eine Zellsuspension hergestellt, die 5.000 Zellen pro Milliliter enthielt.

Als nächstes wurde das RPMI-Medium von den vorgewärmten Zellkulturschalen abpipettiert und jeweils zwei Milliliter der Zellsuspension, also 10.000 Zellen, in die Schalen gegeben. Diese wurden dann für 45 min im Brutschrank inkubiert und anschließend einmal mit PBS gespült, um nicht adhärente Zellen zu beseitigen. Um besser zählen zu können und um ein Austrocknen der Schalen zu verhindern, wurde danach wieder etwas Medium in die Schalen gegeben.

Die adhärenen Zellen in allen zwölf Lochverstärkungsringen der drei Zellkulturschalen wurden unter dem Mikroskop gezählt. Dabei waren durch eine ständige Schüttelbewegung die nicht-adhärenen Zellen auszumachen.

3.1.7 Migrationsassay

Um die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen *in vitro* zu untersuchen, wurde die Transmigration durch eine Transwell-Membran mit Fibronectin-Beschichtung beurteilt. Hierzu wurde eine 10 µg/ml konzentrierte Fibronectin-Lösung in PBS hergestellt. Davon wurden jeweils 950 µl pro Vertiefung in eine 24-well Zellkulturplatte gegeben. Anschließend wurden die Transwell-Einsätze in die Vertiefungen der Zellkulturplatte eingesetzt und auch von oben mit je 150 µl der Fibronectin-Lösung bedeckt. Die Transwell-Einsätze wurden eine Stunde bei Raumtemperatur in der Fibronectin-Lösung inkubiert. Danach wurden sie kurz in sterilem H₂O gespült und sofort für den Versuch verwendet. Während der Inkubationzeit für die Beschichtung der Transwell-Einsätze wurden die Tumorzellen aus den Zellkulturflaschen trypsiniert und gezählt. Aus jeweils 350 000 Zellen wurde ein Zellpellet gewonnen und dieses wurde in 1050 µl serumfreien Optimem-Medium resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, um alle Reste des ursprünglichen RPMI-Mediums aus dem Versuchsaufbau zu eliminieren. Pro Zelllinie wurde ein sechsfacher Ansatz des Versuchs durchgeführt.

Die Fibronectin-beschichteten Transwell-Einsätze wurden in eine neue 24-well Zellkulturplatte gegeben, deren Vertiefungen bereits jeweils 500 µl konditioniertes Medium enthielten. Als konditioniertes Medium wurde Optimem-Medium genutzt, welches sich 24 Stunden auf konfluenten COS7-Zellen befunden hatte. Dieses so „konditionierte“ Medium enthält die Stoffwechselprodukte der fibroblastenähnlichen COS7-Zellen, zu denen unter anderem auch Wachstumsfaktoren gehören. So wird für die migrierenden Zellen ein Migrationsreiz aus dem serumfreien Optimem-Medium hin zu dem mit Wachstumsfaktoren angereicherten COS7-Überstand erzeugt.

Als nächstes wurden jeweils 150 µl der verdünnten Zellsuspension in die Transwell-Einsätze gegeben und der Versuchsaufbau für drei Stunden im CO₂-Inkubator inkubiert.

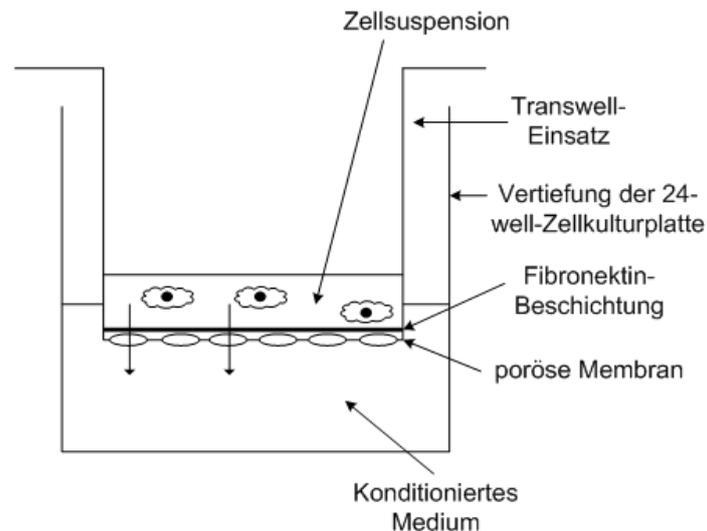


Abbildung 5: Versuchsaufbau des Migrationsassays

Anschließend folgte die Färbung der migrierten Zellen mit Hämalaun und Eosin. Dazu wurden die Transwell-Einsätze aus der 24-well-Zellkulturplatte herausgenommen und mit einem Wattestäbchen von innen gereinigt, um innen noch verbliebene Zellen zu beseitigen. Dann wurden die, durch die Transwellmembran migrierten, Zellen fünf Minuten in eiskalter Methanol-Lösung fixiert. Darauf folgte eine fünfminütige Inkubation der Transwell-Einsätze in Hämalaun, ein kurzer Waschschrift und dann ein fünfminütiges Bläuen in destilliertem H₂O. Anschließend wurde fünf Minuten mit Eosin gefärbt. Nach jedem der vier Färbeschritte wurden die Transwell-Einsätze jeweils von innen mit einem Wattestäbchen gereinigt. Nach einem erneuten Spülen mit destilliertem H₂O, wurden die Einsätze nacheinander in eine aufsteigende Ethanolreihe gegeben, bestehend aus einmal 50 %-igem, zweimal 70 %-igem, zweimal 96 %-igem und zweimal 100 %-igem Ethanol.

Im Anschluss daran wurden die Transwell-Einsätze erneut gründlich mit einem Wattestäbchen von innen gereinigt und dann die Membranen mit einem Skalpell herausgeschnitten. Sie wurden einmal in Xylol getaucht und dann auf einen Objektträger aufgebracht.

Der Objektträger wurde mit Eukitt und einem Deckgläschen versiegelt. Die durch die Membran migrierten Zellen wurden mit einem Lichtmikroskop gezählt. Aus den sechs Werten pro Konstrukt wurde ein Mittelwert und eine Standardabweichung bestimmt.

3.1.8 Invasionsassay

Das invasive Verhalten der Zellen wurde, ähnlich wie beim Migrationsassay, in einem Transwell-System getestet. Die Beschichtung der Transwell-Einsätze erfolgte hier mit einer Matrigel-Lösung.

Die Matrigel-Matrix[®] wird aus murinen *Engelbreth-Holm-Swarm* Sarkomzellen gewonnen. Dieser Tumor produziert die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix und die, aus ihm hergestellte, Matrigel-Matrix[®] kann zur Simulation einer Basalmembran verwendet werden (Kleinman H.K., 1986).

Um ein frühzeitiges Gelieren der Matrigel-Lösung zu vermeiden, wurde die Lösung die ganze Zeit auf Eis gehalten und mit gekühlten Pipettenspitzen pipettiert. Für die Beschichtung wurden die Transwell-Einsätze in die Vertiefungen einer 24-well Zellkulturplatte gegeben. In jeden Transwell-Einsatz wurden zunächst 12,5 µl der Matrigel-Lösung pipettiert. Durch Beklopfen des Zellkulturplatten-Bodens wurde die Lösung in den Transwells gleichmäßig verteilt. Dann wurde der Versuchsaufbau für 30 min im CO₂-Inkubator inkubiert, damit die Matrigel-Lösung gelieren konnte. Diese Schritte wurden danach mit weiteren 12,5 µl der Matrigel-Lösung wiederholt. Während der Inkubationzeit für die Beschichtung der Transwell-Einsätze wurden die Tumorzellen aus den Zellkulturflaschen trypsiniert und gezählt. Aus jeweils 350 000 Zellen wurde ein Zellpellet gewonnen und dieses wurde in 350 µl serumfreien Optimum-Medium resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, um alle Reste des ursprünglichen RPMI-Mediums aus dem Versuchsaufbau zu eliminieren. Pro Zelllinie wurde ein sechsfacher Ansatz des Versuchs durchgeführt.

Für den weiteren Versuchsaufbau wurden je 500 µl konditioniertes Medium (vgl. 3.1.7) pro Vertiefung in eine neue 24-well-Zellkulturplatte pipettiert. Dann wurden die Transwell-Einsätze mit der gelierten Matrigel-Lösung eingesetzt und jeweils 50 µl der eingestellten Zellsuspension in die Transwell-Einsätze gegeben. Der Versuchsaufbau wurde anschließend für 24 Stunden im CO₂-Inkubator inkubiert, um den Tumorzellen ausreichend Zeit zur Invasion in die Matrigel-Matrix zu geben. Auch bei den Invasionsversuchen wurden die, durch die Matrigel-Matrix migrierten, invasiven Tumorzellen in Methanol fixiert und mit Hämalaun und Eosin gefärbt, bevor die Membranen aus den Transwell-Einsätzen ausgeschnitten und auf Objektträgern konserviert wurden (vgl. 3.1.7.). Bei der Auswertung des Versuches wurden je vier -zufällig ausgewählte- hochauflösende Gesichtsfelder einer Membran gezählt. Man kam

so zu vier mal sechs Gesichtsfeldern, aus deren Zellzahl ein Mittelwert und eine Standardabweichung gebildet wurden.

3.1.9 XTT- Proliferationsassay

Die Wachstumskinetik der Zellen wurde mit Hilfe eines XTT-Proliferationsassay erfasst. Das Tetrazoliumsalz XTT wird dabei durch mitochondriale Enzyme metabolisch aktiver Zellen reduziert. Es bilden sich Formazan-Farbstoffe mit gelb-oranger Farbe, die spektralphotometrisch gemessen und quantifiziert werden können (Scudiero D.A., 1988). Um an sechs aufeinander folgenden Tagen die Proliferation messen zu können, wurden sechs 96-well-Zellkulturplatten vorbereitet: Die äußersten Vertiefungen der Platte wurden mit jeweils 200 µl PBS gefüllt, um später eine Feuchtinkubator-Atmosphäre zu schaffen. Die Zellen für den Versuch wurden vom Boden ihrer Zellkulturflaschen gelöst, gezählt und eine Zellsuspension mit 10.000 Zellen pro Milliliter hergestellt. Es wurde ein sechsfacher Ansatz von jedem Konstrukt mit jeweils 2.000 Zellen pro Vertiefung auf jeder der sechs 96-well Zellkulturplatten ausgesät. Um einen Referenz-Wert für die spätere Messung zu erhalten, wurde außerdem in sechs Vertiefungen jeder Platte nur je 200 µl RPMI-Medium pipettiert. Die Zellkulturplatten wurden während des Versuchs bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Die Messung der Absorption der ersten Platte erfolgte, sobald die Zellen adhärent waren und dann im Folgenden alle 24 Stunden mit einer weiteren Zellkulturplatte. Für die Farbreaktion wurde die XTT-Lösung im Verhältnis 1:100 in frischem RPMI-Medium verdünnt. Als Redoxpartner wurde bei der Reaktion Pyrazin-Methyl-Sulfat (PMS) verwendet. Dabei wurde die PMS-Lösung im Verhältnis 1:200 der XTT-RPMI-Lösung zugesetzt. Von dieser Lösung wurden dann jeweils 50 µl pro Vertiefung in die Zellkulturplatte pipettiert. Die Zellkultur-Platte wurde dann für eine Stunde im CO₂-Inkubator inkubiert, um die Redox-Reaktion mit Farbumschlag zu ermöglichen. Die Messung der Absorption in den einzelnen Vertiefungen erfolgte mit Hilfe des *Microplate-Readers*. Dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm sowie bei einer Referenzwellenlänge von 655nm gemessen. Von jedem Messwert wurde der Mittelwert der Messwerte der Mediumkontrolle subtrahiert und aus den errechneten Differenzen ein Mittelwert und eine Standardabweichung gebildet.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für den Proteinnachweis im Western Blot musste gewährleistet werden, dass von jeder Probe die gleiche Menge an Proteinen auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen wird. Deshalb wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Zelllysate bestimmt. Hierzu wurde die Bradford-Methode zur Proteinmessung genutzt. Bei dem Bradford-Reagenz handelt es sich um einen Farbstoff, der nach Interaktion mit Protein-Seitenketten ein anderes Absorptionsmaximum in der photometrischen Messung zeigt (Bradford M.M., 1976). Für die Proteinbestimmung wurden 2 µl des Proteinlysates auf insgesamt 800µl mit Aqua dest. verdünnt und dann 200 µl der Bradford-Reagenz hinzugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und nach 5 Minuten erfolgte die spektralphotometrische Extinktions-Messung. Anhand einer Standard-Protein-Verdünnungsreihe mit 20 µg, 10 µg und 5 µg BSA, die ebenso verdünnt und mit dem Bradford-Reagenz versetzt wurde wie die Proben, konnte die Extinktion in Bezug zur Menge an Protein gesetzt werden. Als Referenzwert diente bei allen Messungen der Wert der Extinktion des Zelllysispuffers ohne Proteine, der genauso mit Aqua dest. verdünnt und mit Bradford-Reagenz versetzt wurde. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen. Danach konnten mit Hilfe der Extinktionswerte der Standard-BSA-Verdünnungsreihe die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden. Dabei wurde gewährleistet, dass sich der Extinktionswert der Proben im Rahmen der Extinktionswerte der Standard-BSA-Verdünnungsreihe befand, und die Werte für die Extinktion nicht über 1,0 hinausgingen.

3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die unterschiedlichen Proteine des Zelllysates ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese genutzt. Ladungsunterschiede der Proteine bedingen dabei eine unterschiedlich schnelle elektrophoretische Mobilität in einem Polyacrylamidgel unter elektrischem Gleichstromfeld.

Dazu wurde zunächst ein Polyacrylamid-Gel hergestellt. Das Polyacrylamidgel entsteht durch Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit N,N-Methylenbisacrylamid als Vernetzer und Ammoniumpersulfat und TEMED als Katalysatoren. Nach dem Mischen der einzelnen

Komponenten des Trenngels (Tabelle 7) wurde die Lösung zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen, die durch Platzhalter in einem bestimmten Abstand zueinander gehalten wurden. Während der Polymerisation wurde das Gel mit Ethanol überschichtet und gewartet, bis die Polymerisation abgeschlossen und damit das Gel völlig fest geworden war. In dieser Zeit wurden die Komponenten des Sammelgels gemischt (Tabelle 8). Die Sammelgel-Lösung wurde dann auf das bereits polymerisierte Trenngel gegeben. Es wurde ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt, der nach der Polymerisation entfernt wurde und Taschen im Gel zurückließ, in welche dann die Proteinproben gegeben werden konnten.

Die Aliquots der Proteinproben wurden mit Proteinlysispuffer verdünnt, so dass danach alle Proben die gleiche Proteinkonzentration aufwiesen. Diesen Aliquots wurde SDS und β -Mercaptoethanol in Ladepuffer zugesetzt. Dabei löst das SDS die Wasserstoffbrücken der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine, während das β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken der Proteine reduziert und damit spaltet. Die Proben wurden danach gut gemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

Das polymerisierte Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer mit dem Elektrophoresepuffer (Tabelle 6) gegeben und die Proben sowie ein vorgefärbter Marker, der Standard-Proteingrößen enthält, in die Taschen des Gels gegeben. Die Proteine wurden dann bei angelegten 200 Volt je nach Größe bzw. Ladung im Polyacrylamidgel aufgetrennt.

3.2.3 Western-Blot-Verfahren

Um die in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine einer Detektion zugänglich zu machen, wurden sie im Western Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurde ein elektrischer Gleichstrom orthogonal zum Polyacrylamidgel angelegt, der die Proteine aus dem Gel direkt auf die dem Gel aufgelagerte Nitrocellulose-Membran übertrug. Dazu wurde ein Wet-Blot-Verfahren angewendet. Whatman-Papier, Membran und Gel wurden in Transferpuffer getränkt. Dann wurde die Membran auf zwei Lagen Whatman-Papier gelegt. Das Gel wurde direkt auf die Membran aufgelegt und darauf erneut zwei Lagen Whatman-Papier. Dieser Stapel wurde luftblasenfrei in eine Blotting-Kassette mit zwei Schwämmchen eingeklemmt, die ebenfalls vorher in Transferpuffer getränkt worden waren. Die Kassette wurde in eine Wet-Blot-Kammer mit gekühltem Transferpuffer (Tabelle 6) gegeben. Die Proteine wurden dann bei 90 Volt für circa 1 ½ Stunden auf die Membran übertragen.

3.2.4 Immunologischer Proteinnachweis

Zur Visualisierung der Proteine wird ein immunologisches Verfahren angewandt. Das Prinzip hierbei ist eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion gegen das zu detektierende Protein auf der Nitrocellulose-Membran. In einem weiteren Schritt bindet ein Sekundärantikörper, der gegen den konstanten Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist. Dieser Sekundärantikörper ist an eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, welche in einem Luminol-Gemisch enzymatisch eine Lichtreaktion erzeugt und damit den Nachweis des Proteins auf einem Röntgenfilm ermöglicht.

Vor Beginn der Antikörperinkubation wurde, mittels einer Ponceau-S-Lösung der Transfererfolg überprüft. Dazu wurde die Nitrocellulose-Membran mit den übertragenen Proteinen für 5 Minuten in der Ponceau-Lösung geschüttelt und dann mit Aqua dest. abgespült, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Vor Beginn der Antikörperinkubation wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran mit einer Blockierungslösung für 30 Minuten blockiert. Die Blockierungslösung bestand, je nach Antikörper und Angaben des Herstellers, aus BSA oder Milchpulver oder beiden Komponenten in Waschpuffer. Anschließend folgte die Inkubation mit dem -für das Protein spezifischen- Primärantikörper. Dazu wurde dieser in Blockierungslösung verdünnt und mit der Membran in ein 50 ml Falcon-Tube gegeben. Unter ständiger Rotation des Falcon-Tubes fand die Antigen-Antikörper-Reaktion auf der Membran statt. Die Inkubationszeit, sowie die Konzentration des Antikörpers in der Blockierungslösung waren dabei abhängig vom jeweiligen Primärantikörper. Nach der ersten Inkubation folgten drei Waschschritte von jeweils 5 Minuten. Dabei wurden ungebundene Antikörper weggewaschen. Der Sekundärantikörper wurde wie der Primärantikörper in Blockierungslösung verdünnt und für eine Stunde auf der Membran inkubiert. Danach folgten erneut drei Waschschritte für jeweils 5 Minuten. Für die Meerrettich-Peroxidase-Reaktion wurden die Komponenten der ECL-Lösung (Tabelle 6) frisch zusammengemischt und dann für 5 Minuten auf die Membran gegeben. Dann wurde die Membran in eine Röntgenkassette gelegt und es wurden in der Dunkelkammer Röntgenfilme aufgelegt. Dies geschah -je nach Stärke des Lichtsignals- verschieden lang. Anschließend folgte die Entwicklung und Fixierung der belichteten Röntgenfilme in der Dunkelkammer.

3.2.5 Nachweis phosphorylierter Proteine

Um die Phosphorylierung und damit die Aktivierung Rac-abhängiger Zellsignalwege zu untersuchen, wurden Phospho Blots durchgeführt. Zur Vorbereitung des Versuchs wurden die Zellen in 10 cm Zellkultur-Schalen ausgesät, so dass sie am nächsten Tag zu 70-80% konfluent waren. Dann wurde das Zellkultur-Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gespült, um alle Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurde serumarmes Medium mit 0,5 % FCS auf die Zellen gegeben, um sie in ihrem Zellzyklus zu synchronisieren. Am dritten Tag konnte der Versuch durchgeführt werden. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und die Schalen zweimal mit kaltem TBS-Puffer gewaschen, welchem Natrium-Orthovanadat, Natrium-Fluorid und EDTA frisch zugesetzt waren, um die Phosphorylierungen der Signalproteine zu erhalten. Dann wurde der Lysispuffer für phosphorylierte Proteine (Tabelle 5) auf die Zellen gegeben und die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Zellkultur-Schale abgekratzt. Sie wurden dann in ein Reaktionsgefäß überführt. Für die Lyse wurden sie 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um den Zelldetritus aus dem Lysat zu eliminieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Proteingehalt der Lysate wurde mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt. Dann wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt und anschließend die Proteine im Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Der Transfer wurde mittels Ponceau-Färbung überprüft (vgl. 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3). Die Membranen wurden anschließend mit der Blockierungslösung des entsprechenden Antikörpers für 30 Minuten blockiert und über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper inkubiert, der sich gegen die phosphorylierte Form der Signalmoleküle richtete. Am vierten Tag erfolgte die weitere Immundetektion. Die Membran wurde gewaschen und dann 1 ½ Stunden mit dem jeweiligen Sekundärintikörper inkubiert. Danach wurde die Membran erneut gewaschen und die Signalproteine mit Hilfe der HRP-Reaktion in der ECL-Lösung auf einem Röntgenfilm detektiert (vgl. 3.2.4).

Anschließend wurden die gebundenen Antikörper mit Hilfe von Stripping-Puffer (Tabelle 15) von der Membran gelöst. Im nächsten Schritt fand nun die Immundetektion der gesamten, also phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Formen, der Signalproteine statt. Die unspezifischen Bindungsstellen der Membran wurden erneut blockiert und der Primärintikörper

über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Am letzten Tag erfolgte dann -analog zur ersten Immundetektion- die Visualisierung der gesamten Formen der Signalproteine.

3.2.6 Immunfluoreszenzuntersuchungen

Für die Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden die Zellen in 6-well Zellkulturplatten ausgesät. Vorher wurden sterile Deckgläschen in die Vertiefungen der Zellkulturplatten gelegt, damit die Zellen auf den Deckgläschen adhären konnten. Das Zellwachstum wurde an den folgenden Tagen immer wieder kontrolliert bis die gewünschte Zellkonfluenz erreicht war. Dann wurde jede Vertiefung der 6-well Zellkulturplatte zweimal mit PBS gespült und die Zellen durch Inkubation in 3,7%-igem Formaldehyd in PBS für 30 Minuten fixiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen in PBS, wurden die Zellen für 3 Minuten in einer 0,5%-igen Triton-X100-Lösung in PBS inkubiert. Dieser Schritt machte die Zellmembran permeabel für die folgende Antikörperinkubation. Vor der Antikörperinkubation wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation in Blockierungslösung blockiert. Von dem verdünnten Erstantikörper wurden tropfenweise 95 µl auf eine Glasplatte mit Parafilm-Überzug pipettiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit dem Zellrasen nach unten in den Tropfen gelegt und 1 ½ Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Deckgläschen zurück in die 6-well Zellkulturplatte gegeben, um sie erneut zweimal für 10 Minuten in PBS zu waschen. Es wurde eine weitere Antikörper-Lösung hergestellt, die zum einen Fluoreszenzisothiocyanat (FITC)-gekoppelte Sekundär-Antikörper und zum anderen Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC)-Phalloidin enthielt. TRITC ist dabei als Fluoreszenzfarbstoff an Phalloidin gebunden, welches irreversibel an F-Aktin bindet und so in Kombination mit TRITC das Zytoskelett sichtbar machen kann. Von dieser Lösung wurden erneut jeweils 95 µl-Tropfen auf eine mit Parafilm überzogene Glasplatte gegeben, die Deckgläschen mit dem Zellrasen nach unten hineingelegt und 1 ½ Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Deckgläschen mit den Zellen erneut in PBS gewaschen. Um später unter dem Fluoreszenzmikroskop die Ebene der Zellkerne besser zu finden zu können, wurde zusätzlich eine Färbung mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (Dapi) durchgeführt. Dazu wurden die Deckgläschen 10 Minuten in der Dapilösung inkubiert und dann erneut in PBS gewaschen. Zuletzt wurde ein Tropfen Vectashield auf einen Objektträger gegeben, das Deckgläschen mit dem Zellrasen nach unten hineingelegt und die Ränder mit Nagellack versiegelt. Bis zur Betrachtung

tung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Objektträger bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

3.2.7 Zymographie

Zum Nachweis der Matrix-Metalloproteinasen im Zellkulturüberstand wurde eine Zymographie durchgeführt. Dazu musste zunächst der Zellkulturüberstand gesammelt und aufbereitet werden.

Die Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert, bis sie einen zu 70-80 % konfluenten Zellrasen aufwiesen. Dann wurde das Vollmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gespült und schließlich 15 ml serumfreies Optimem-Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellkulturflaschen wurden dann für weitere 24 Stunden im CO₂-Inkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und 5 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um feste Bestandteile wie Zelldetritus an den Boden des Tubes zu bringen.

Dann wurde der Überstand in Amicon-Ultra-Röhrchen überführt, bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und dadurch bis zu einem Endvolumen von 200 µl aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde durch die Bradford-Protein-Messung bestimmt (vgl. 3.2.1). Es wurde ein 8 %-iges Trenn-Gel gegossen, welches 0,2 % Gelatine enthielt. Dazu wurde eine 1%-ige Gelatine-Lösung hergestellt, die in der Mikrowelle aufgeköcht wurde, bis sich das Gelatinepulver gelöst hatte. Das Trenngel wurde nach denselben Vorgaben für SDS-Polyacrylamidgele gegossen, wie sie bereits genannt wurden (Tabelle 7). Allerdings wurde die Menge des Wassers um die Menge der Gelatinelösung reduziert. Das Sammelgel entsprach den bereits genannten Vorgaben (Tabelle 8). Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, der weder β -Mercaptoethanol noch DTT enthielt, um Reduktionen der Proteine und damit eine Inaktivierung zu vermeiden. Dann wurden die konzentrierten Proteinproben 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend zusammen mit einem Protein-Standard-Marker auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel für eine Stunde in einer 2,5 %-igen Triton-X100-Lösung auf einem Inkubations-Schüttler bei 37 °C gewaschen, um das SDS aus dem Gel zu entfernen. Nach der Hälfte der Zeit wurde die Lösung ausgewechselt. Das Gel wurde dann für 36 Stunden im Reaktionspuffer (Tabelle 11) inkubiert, um den Matrix-Metalloproteinasen Zeit zu lassen, die Gelatine dort abzubauen, wo sie nach der Gelelektrophorese aufgetrennt worden waren. Auch dieser Schritt fand auf dem Inkubations-Schüttler statt. Die Lösung wurde etwa eine Stunde nach Inkubationsbeginn noch

einmal ausgetauscht. Es folgte die Färbung mit einer Coomassie-Blau-Färbelösung für vier Stunden auf dem Inkubations-Schüttler, sowie eine sich anschließende Entfärbung (Tabelle 11). Das Gel erschien nun blau, mit Ausnahme der Stellen, an denen die Matrix-Metalloproteinasen die Gelatine abgebaut hatten. Unter Gegenlicht wurde das Gel fotografiert und anschließend auf Whatman-Papier im Vakuumtrockner getrocknet.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Transformation

Um die DNA des Vollängen-Tiam1-Konstruktes zu amplifizieren, wurden kompetente DH5 α - Escherichia coli- Bakterien mit dem Konstrukt transformiert. Zu 200 μ l der kompetenten Zellen wurde 1 μ g DNA gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und dann 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 90 Sekunden bei 42 °C inkubiert. Dieser „Hitze-Schock“ sorgt dafür, dass Poren in der Bakterienmembran entstehen und die DNA aufgenommen werden kann. Es erfolgte eine erneute Abkühlung auf Eis für zwei Minuten. Dann wurden 900 μ l LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz eine Stunde bei 37 °C in einen Schüttler inkubiert. Parallel dazu wurden Agarplatten mit Ampicillin in einem Brutschrank für Bakterien vorgewärmt. Nach Ablauf der Stunde wurden die Bakterien zu einem Pellet zentrifugiert, 900 μ l des Überstandes abpipettiert und das Bakterienpellet in der verbliebenen Lösung durch Vortexen wieder gelöst. Dann wurde die Lösung auf die vorgewärmten Agarplatten gegeben und eingestrichen. Die Platten wurden über Nacht im Bakterienbrutschrank inkubiert.

3.3.2 Präparation der transformierten Kolonien

Nach der Transformation wurden fünf Kolonien von der Agarplatte gepickt und von jeder Kolonie eine Mini-Präparation der Plasmid-DNA mit dem Qiagen-Mini-Präp[®]-Kit nach dem Protokoll des Herstellers gemacht. Dazu wurden die einzelnen Kolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und dann jede Kolonie in LB-Medium, welches 100

$\mu\text{g/ml}$ Ampicillin enthielt, über Nacht bei 220 rpm und 37 °C angeschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien zu einem Pellet zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde das Bakterienpellet in kaltem Resuspensionspuffer resuspendiert und anschließend Lysepuffer hinzugegeben. Die Bakterien wurden in 5 Minuten auf Eis lysiert. Anschließend wurde Neutralisationspuffer zu dem Ansatz gegeben und der Zelldetritus abzentrifugiert. Parallel dazu wurden die Qiagen-Säulen[®] nach den Angaben des Herstellers equilibriert und der Überstand nach dem Zentrifugieren direkt auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden zweimal mit Waschpuffer gewaschen und dann die DNA mit Elutionspuffer in Eppendorf-Reaktionsgefäße eluiert.

3.3.3 Fällung und Aufbereitung der DNA

Um die DNA zu fällen, wurden 500 μl Isopropanol zu 50 μl eluierter DNA gegeben und bei 14.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abpipettiert und die DNA mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet getrocknet und mit 50 μl sterilem H_2O bei 4°C gelagert.

3.3.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers, welches die Extinktion bei 260 nm misst. Die Proben wurden bei DNA aus einer Maxi-Präparation 1:100 und bei DNA aus einer Mini-Präparation 1:20 in sterilem H_2O verdünnt. Bei der Messung war es wichtig, dass der gemessene Extinktionswert zwischen 0,1 und 1,0 lag.

Eine Extinktion von 1,0 entspricht dabei 50 ng/ μl DNA.

Durch die Bestimmung des Verhältnisses der Extinktion bei 260 nm zur Extinktion bei 280 nm, lässt sich darüber hinaus die Reinheit der Probe bestimmen. Die Ratio sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.3.5 Herstellen einer Glycerin-Kultur

Nachdem der positive Klon durch Sequenzierung bestimmt worden war, wurden erneut kompetente *E. coli* mit diesem Plasmid transformiert und auf Agar-Platten mit Ampicillin ausge-

strichen. Die Bakterien wurden über Nacht im Bakterienbrutschrank inkubiert, um neue Kolonien auf der Platte bilden zu können. Am nächsten Tag wurde unter sterilen Bedingungen 300 µl Glycerin in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Mit 1 ml LB-Medium wurden die Kolonien durch eine Glas-Öse von der Oberfläche gelöst und 300 µl davon in das Glycerin im Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Dieser Ansatz wurde als Glycerol-Stock bei -80°C gelagert.

3.3.6 Isolation von Plasmid-DNA

Alle Konstrukte außer das Vollängen-Tiam1- Konstrukt waren bereits als Glycerolstock vorhanden (Tabelle 27). Zur Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterien des Glycerolstocks wurde eine DNA-Maxi-Präparation mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi-Kits[®] durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden zunächst 200 ml autoklaviertes LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben gegeben und 100 µg/ml Ampicillin hinzugesetzt. Aus dem Glycerolstock des Konstruktes wurde eine Pipettenspitze abgenommen und in den Erlenmeyerkolben abgeworfen. Der Ansatz wurde über Nacht bei 220 rpm und 37 °C auf dem Schüttler inkubiert, um die Bakterien des Glycerolstocks zu amplifizieren. Am nächsten Tag konnte die Maxi-Präparation durchgeführt werden. Dazu wurden die Bakterien zu einem Pellet zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml des Resuspensionspuffers wieder gelöst. Dann wurden 10 ml des Lysispuffers hinzugegeben und der Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 ml des Neutralisationspuffers hinzugefügt. Anschließend wurde der Ansatz 90 Minuten bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Am Ende der Zentrifugationszeit wurden zur Vorbereitung des nächsten Schritts die Qia-Tips[®] equilibriert. Die klare Schicht der zentrifugierten Lösung wurde abpipettiert und direkt in die equilibrierten Säulen gegeben. Die Lösung durchlief die Säulen und nur die DNA wurde gebunden. Dann wurden die Säulen mit der gebundenen DNA zweimal mit Waschpuffer gereinigt und die DNA schließlich mit einem Elutionspuffer wieder eluiert. Die DNA wurde dann, wie oben beschrieben, gefällt und ihre Konzentration gemessen (3.3.3 und 3.3.4).

4 Ergebnisse

4.1 Transfektionsnachweis

Nach Selektion der transfizierten Zellen über deren Blasticidinresistenz, wurde der Erfolg der Transfektion und die Expression der transfizierten Konstrukte mittels Proteinnachweis im Western Blot-Verfahren überprüft.

Die Expression der Rac3-Konstrukte konnte sowohl über den direkten Nachweis mit einem Primäantikörper gegen Rac als auch über den indirekten Nachweis des FLAG-Tags der Rac-Konstrukte gezeigt werden (Abbildung 6, Abbildung 7). Dabei ist das FLAG-Tag (1 kDa) ein Bestandteil des Expressionskonstruktes und führt zu einem Fusionsprotein, welches über das *Tag* leichter nachgewiesen werden kann. Außerdem besteht die Möglichkeit zwischen dem Wildtypprotein der Zellen und der transfizierten Variante des Proteins zu unterscheiden.

In Abbildung 6 sieht man, dass der Nachweis des FLAG-Tags deutliche Unterschiede zeigt.

Während das Signal des *housekeeping*-Gens α -Tubulin (bei 50 kDa) in allen Proteinlysaten etwa gleich stark ist, zeigt das Proteinlysat aus den Zellen des leeren Vektors kein Signal. Bei dem Proteinlysat aus den Zellen mit Wildtyp-Rac3 ist ein sehr deutliches Signal bei ca. 22kDa zu erkennen und bei dem Proteinlysat aus den Zellen mit V12-Rac3 sieht man eine schwächere Bande auf der gleichen Höhe. Bei dem Proteinlysat aus den Zellen des leeren Vektors sieht man kein Signal, da ohne Insert kein Fusionsprotein der detektierten Größe entsteht.

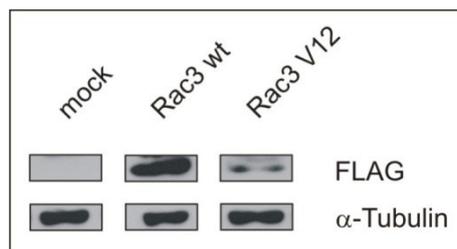


Abbildung 6: Western Blot mit Proteinlysaten stabil mit leerem Vektor, Rac3 wt oder V12-Rac3 transfizierter PC3-Zellen.

Es wurde eine Antikörperinkubation mit anti-FLAG-Tag und anschließend eine Reinkubation der Membran mit anti- α -Tubulin durchgeführt. Die Banden des FLAG-Tags erscheinen bei ca. 22kDa, die Banden des α -Tubulins bei ca. 50kDa. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens fünf unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Parallel wurde die Expression der Konstrukte auch durch den direkten Nachweis von Rac kontrolliert (Abbildung 7). Der Anti-Rac-Primärantikörper kann dabei alle drei Rac-Isoformen detektieren. Nach der Transfektion ist aber davon auszugehen, dass eine Signalverstärkung vor allem auf einer erhöhten Expression der Rac3-Isoform beruht.

Bei in etwa gleich starkem Signal des *housekeeping*-Gens α -Tubulin (50kDa) zeigt sich, dass die stabil mit Wildtyp-Rac3 und V12-Rac3 transfizierten Zellen im Vergleich zum leeren Vektor ein deutlich stärkeres Signal für Rac zeigen.

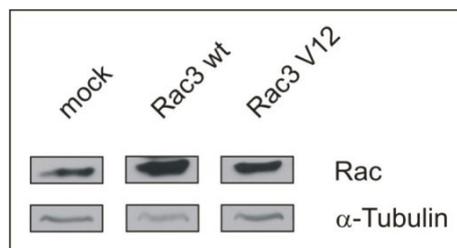


Abbildung 7: Western Blot mit Proteinlysaten stabil mit leerem Vektor, Rac3 wt oder V12-Rac3 transfizierter PC3-Zellen. Es wurde eine Antikörperinkubation mit anti-Rac und anschließend eine Reinkubation der Membran mit anti- α -Tubulin durchgeführt. Die Banden von Rac erscheinen in den mock-transfizierten Zellen bei ca. 21kDa, in den Rac3-transfizierten Zellen auf Grund des zusätzlichen FLAG-Tags bei 22kDa. Die Banden des α -Tubulins sind bei 50kDa zu detektieren. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens fünf unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

In den abgebildeten Western Blots sieht man, dass das konstitutiv aktive V12-Rac3 schwächer exprimiert wird als die Wildtypvariante. Für V12-Rac3 war bei stabiler Transfektion eine Überexpression im gleichen Maße wie für das Wildtyp-Konstrukt nicht zu erreichen. Da sich in den Funktionsassays aber deutliche Effekte zeigten, wurde das -im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt- verminderte Maß der Expression letztlich akzeptiert.

Zum Nachweis der stabilen Transfektion der Tiam1-Konstrukte in die PC3-Zellen wurde ein Primärantikörper gegen ein C-terminales Epitop von Tiam1 verwendet, so dass dieser sowohl das Volllängen- als auch das trunkierte C1199-Tiam1 nachweisen konnte.

Abbildung 8 zeigt die Expression von Tiam1 in den Proteinlysaten der Tiam1-transfizierten PC3-Zellen. Das Signal des Volllängen-Tiam1 erscheint bei einer Größe von ca. 200 kDa, während das Signal des trunkierten C1199-Tiam1 bei einer Größe von ca. 170 kDa detektiert werden kann.

Das Proteinlysate der Zellen mit dem leeren Vektor zeigt eine diskrete Bande bei ca. 200 kDa, die dem endogenen Tiam1 der Zellen entspricht. Das Volllängen-Tiam1-Proteinlysate zeigt auf gleicher Höhe ein deutlich stärkeres Signal trotz geringerer aufgetragener Proteinmenge (zu erkennen am α -Tubulin-Signal des Proteinlysates). Somit zeigt sich deutlich eine Überexpression des Volllängen-Tiam1-Konstruktes in den transfizierten Zellen. Auch das Proteinlysate der Zellen mit dem C1199-Tiam1 zeigt eine deutliche Überexpression der trunkierten Variante.

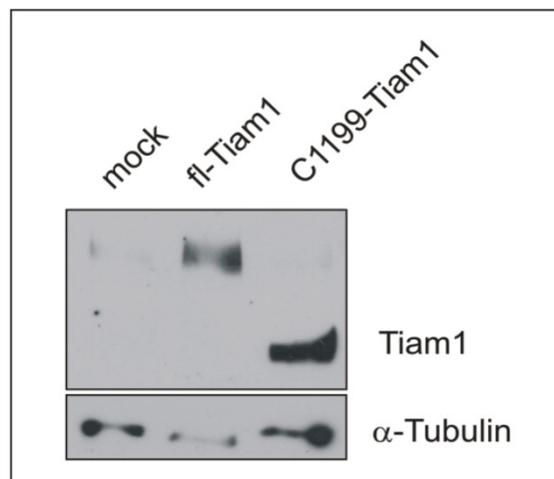


Abbildung 8: Western Blot mit Proteinlysaten stabil mit leerem Vektor, Volllängen- oder C1199-Tiam1 transfizierter PC3-Zellen. Es wurde eine Antikörperinkubation mit anti-C16-Tiam1 und anschließend eine Reinkubation der Membran mit anti- α -Tubulin durchgeführt. Die Banden des Volllängen-Tiam1 erscheinen bei ca. 200 kDa, die des trunkierten C1199-Tiam1 bei ca. 170 kDa. Die Banden des α -Tubulins sind bei ca. 50kDa zu detektieren. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens fünf unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.2 Einfluss der Konstrukte auf den Zellphänotyp

Der Transfektionserfolg war auch an einem deutlich veränderten Phänotyp der Zellen mit den Tiam1-Konstrukten zu erkennen. Diese zeigten nach der Transfektion den für Tiam1-transfizierte Zellen typischen „Pfannkuchen-artigen“ Phänotyp sowie das typische Membran-Ruffling (Michiels F., 1995).

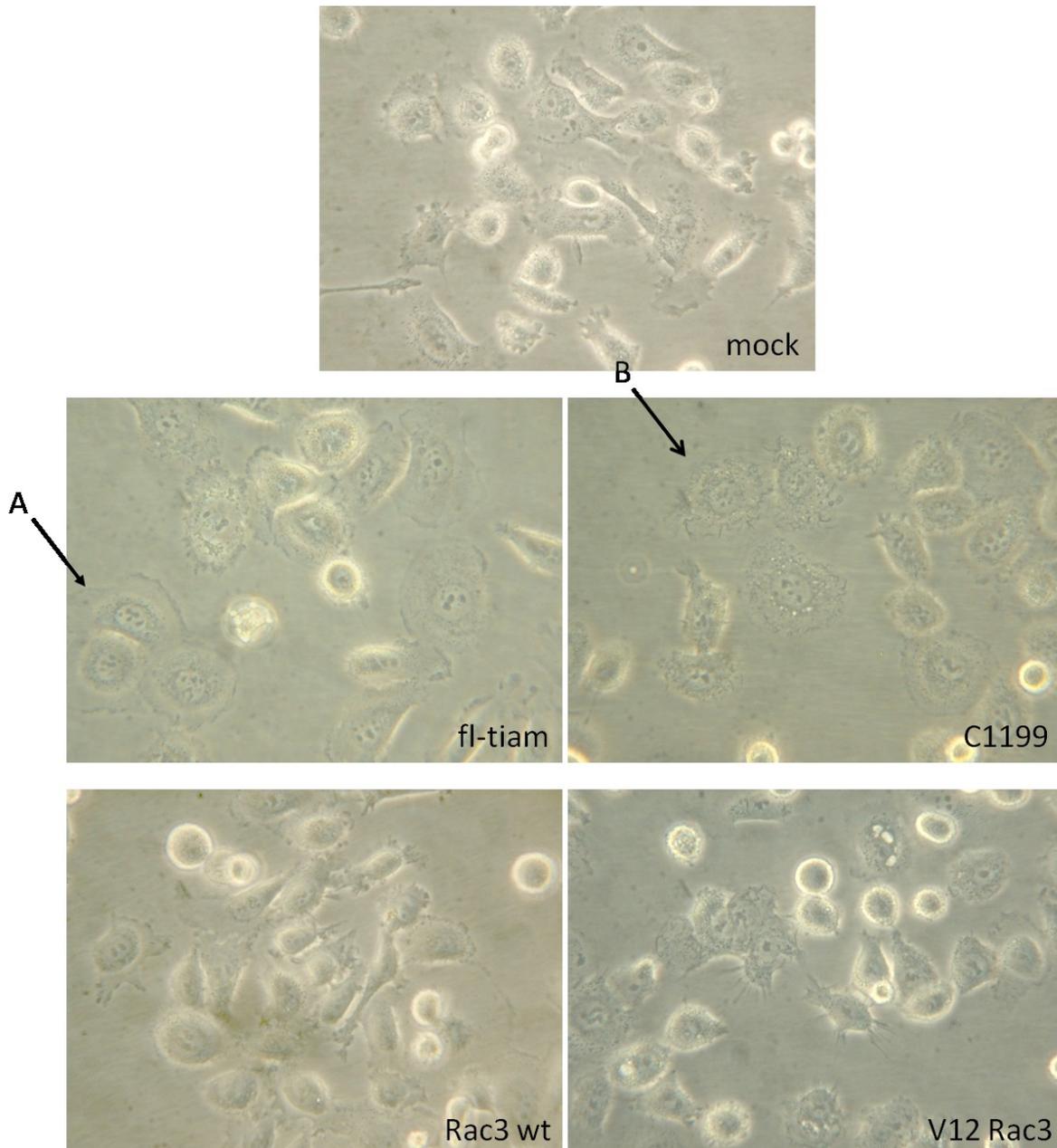


Abbildung 9: Bilder der Zellphänotypen in 400-facher Vergrößerung. Alle Zellbilder zeigen PC3-Zellen, die stabil mit den Konstrukten leerer Vektor (mock), Volllängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Rac3-Wildtyp (Rac3 wt) oder Rac3 V12 (V12-Rac3) transfiziert wurden. Der Pfeil A deutet auf den typischen Pfannkuchen-artigen Phänotyp der Tiam1-Zellen. Der Pfeil B deutet auf eine Tiam1-Zelle mit deutlichem *membrane-ruffling*.

Bei den PC3-Zellen mit dem leeren Vektor (mock) erkennt man eher länglich orientierte oder polygonale Zellen. Die Volllängen-Tiam1-Zellen (fl-tiam) erscheinen deutlich größer und runder als die Zellen mit dem leeren Vektor. Sie zeigen den „Pfannkuchen-artigen“-Phänotyp Tiam1-transfizierter Zellen (Pfeil A). Dieser Aspekt zeigt sich auch bei den C1199-Tiam1 transfizierten PC3-Zellen (C1199). Ebenso zeigen diese Zellen die, die gesamte Zirkumferenz umfassenden kräuseligen Membranverwerfungen (Pfeil B), die dem für Tiam1 typischen

membrane-ruffling entsprechen. Bei den stabil in die PC3-Zellen transfizierten Rac3-Konstrukten (Rac3 wt und V12-Rac3) waren keine spezifischen, reproduzierbaren Unterschiede im Phänotyp verglichen mit mock-transfizierten Zellen zu erkennen.

4.3 Immunfluoreszenz

Um die Zellen in Bezug auf ihre Zell-Zell-Kontakte und Zell-Zell-Adhäsion besser zu charakterisieren, wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt. Dabei wurde ein Primärantikörper gegen β -Catenin verwendet. Wie bereits beschrieben, bindet β -Catenin auf zytoplasmatischer Seite an Cadherine (Yap A.S., 1997). Es kann aber auch -beispielsweise im Rahmen der Signalvermittlung über den wnt/ β -Catenin-Signalweg- zytoplasmatisch akkumulieren und letztlich in den Nukleus gelangen (Guarino M., 2007). Durch einen Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper erscheint es in der Abbildung grün (Abbildung 10). Das Zytoskelett wurde mit Fluoreszenz-gekoppeltem Phalloidin (rot) gefärbt, welches irreversibel an F-Aktin bindet. Die Dapi-Färbung der Zellkerne erscheint blau. Dort, wo sich Aktin- und β -Catenin-Färbung überlagern, erscheint eine gelb-orange Färbung.

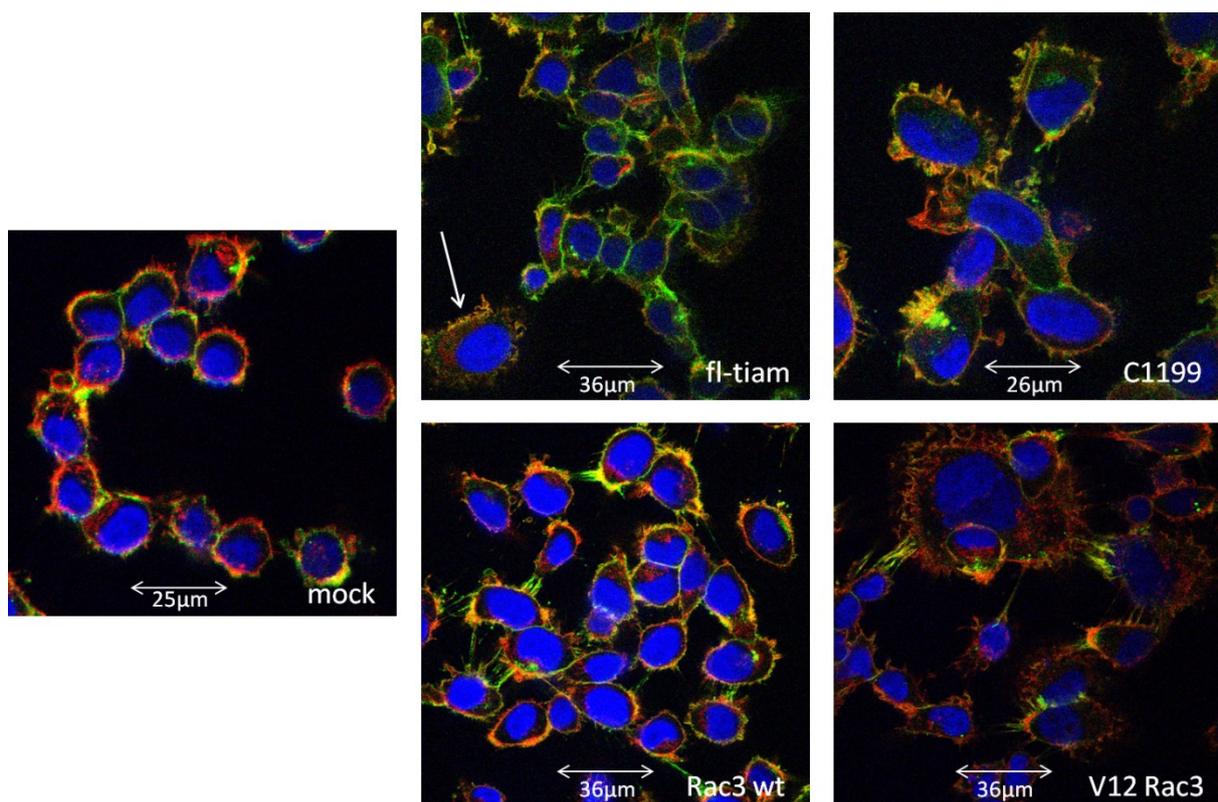


Abbildung 10: Immunfluoreszenzbilder des konfokalen Lasermikroskops von PC3-Zellen mit stabil transfiziertem leeren Vektor (mock), Vollängen- (fl-tiam) oder C1199-Tiam1 (C1199), oder Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) bzw. Rac3 V12 (V12-Rac3).

β -Catenin erscheint durch den FITC-gekoppelten Sekundärantikörper grün. Das Aktinzytoskelett erscheint TRITC-Phalloidin-gefärbt rot. In gelb-orange gefärbten Arealen sind beide Komponenten erhalten. Die Zellkerne sind mit Dapi blau gefärbt. Der weiße Pfeil markiert eine Zelle, die die typischen Merkmale Tiam1 transfizierter Zellen aufweist.

Auch in der Immunfluoreszenz zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den PC3-Zellen mit stabil transfiziertem Volllängen-Tiam1, C1199-Tiam1, Wildtyp-Rac3 und V12-Rac3. Zum einen wurde der, in der Phasenkontrastmikroskopie beschriebene, unterschiedliche Phänotyp der Zellen auch hier ersichtlich, zum anderen wurden Unterschiede der Zellkontakte im Zellverband sowie der Zellfortsätze deutlich.

Die mit dem leeren Vektor (mock) transfizierten PC3-Zellen zeigen in der konfokalen Lasermikroskopie eng beieinander liegende, kleine Zellen mit großer Kern-Plasma-Relation. Unmittelbar zwischen den Zellen gibt es kaum interzelluläre Lücken, was auf eine gute Zell-Zell-Adhäsion hindeutet. An der gelblichen Färbung der interzellulären Grenzen ist eine gemeinsame Lokalisation von β -Catenin und Aktin zu erkennen. Zellfortsätze sind kaum zu beobachten.

Bei den mit Volllängen-Tiam1 transfizierten Zellen (fl-tiam) zeigt sich eine ähnliche Zell-Zell-Adhäsion. Allerdings scheint das β -Catenin in den Zell-Zell-Kontakten weniger stark mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert zu sein, da sich die interzellulären Grenzen fast gänzlich grün darstellen. In der linken unteren Ecke des Bildes (weißer Pfeil) ist eine Zelle mit dem typischen Tiam1-Phänotyp mit „Pfannkuchen“-artigem Aussehen und *membrane-ruffles* erkennbar.

Die mit konstitutiv aktivem C1199-Tiam1 transfizierten PC3-Zellen (C1199) zeigen die deutlichsten morphologischen Veränderungen. Nahezu alle Zellen zeigen das für Tiam1 transfizierte Zellen typische *membrane ruffling*. Die Zellen sind deutlich größer als die mock-transfizierten Zellen und der Zellverband erscheint, auf Grund einer reduzierten Zell-Zell-Adhäsion, weniger kompakt.

Die Wildtyp-Rac3 transfizierten Zellen (Rac3 wt) zeigen in der konfokalen Lasermikroskopie einen ähnlichen Phänotyp wie die mock-transfizierten Zellen. Es sind allerdings teilweise eine leichte Auflockerung des Zellverbandes und deutlich vermehrte Zellausläufer zu erkennen. Diese beiden Aspekte scheinen bei den mit konstitutiv aktivem V12-Rac3-transfizierten Zellen noch stärker ausgeprägt. Zudem zeigt sich, dass bei den Zellen mit leerem Vektor, Volllängen-Tiam1 und Wildtyp-Rac3 deutlich ein äußerer Zellrandsaum durch Aktin, β -Catenin oder beides zu erkennen ist, während dies bei den V12-Rac3-transfizierten Zellen nicht der Fall ist. Vielmehr ist das β -Catenin an der Zellmembran reduziert und die Zellen zeigen ein stärkeres *ruffling* der Membran.

Der Vollständigkeit halber wurden auch Immunfluoreszenzuntersuchungen mit einem Primärantikörper gegen E-Cadherin durchgeführt. Allerdings bestätigten sich die Ergebnisse von Davies et al. (Davies G., 2000), die beschrieben haben, dass die PC3-Prostatakarzinomzelllinie keine E-Cadherin-Expression aufweist. Auch in den transfizierten PC3-Zellen ließ sich keine Expression von E-Cadherin nachweisen (Die entsprechenden Bilder wurden nicht gezeigt).

4.4 Adhäsionsassay

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht nur die Zell-Zell- sondern auch die Zell-Substrat-Adhäsion untersucht. Als Substrat wurde Laminin als eine Hauptkomponente der Basalmembran und wichtige Komponente der extrazellulären Matrix verwendet (Giancotti F.G., 1999). Es zeigte sich, dass Vollängen-Tiam1, C1199-Tiam1 und konstitutiv aktives V12-Rac3 in den PC3-Zellen zu einer signifikanten Adhäsionssteigerung an Laminin führten (jeweils $p \leq 0,001$), während Wildtyp-Rac3 keine nennenswerten Effekte induzierte (Abbildung 11).

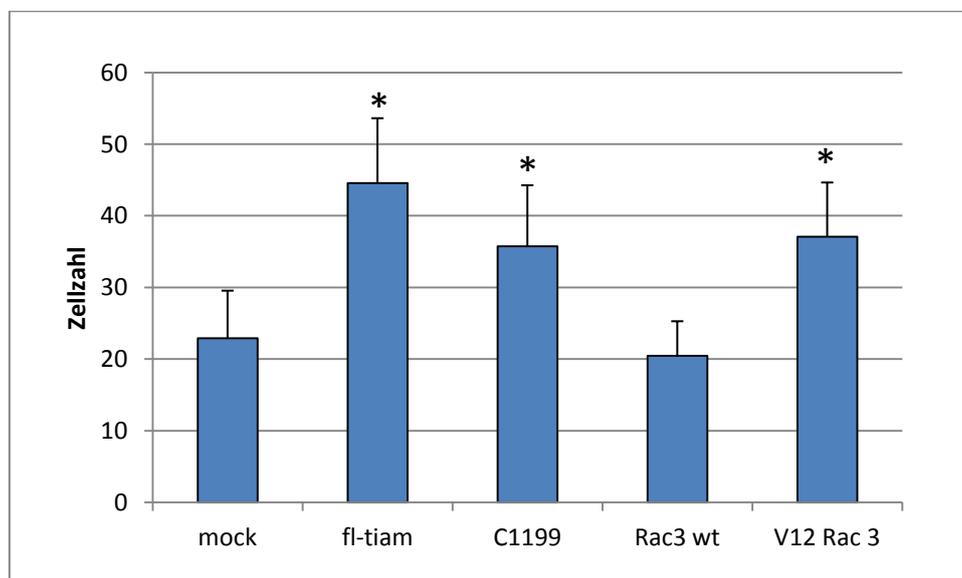


Abbildung 11: Adhäsionsassay an Laminin. Die PC3-Zellen wurden stabil mit dem leeren Vektor (mock), Vollängen (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3V12) transfiziert. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen 12 verschiedener Messwerte eines Adhäsionsassays (*, $p \leq 0,001$). Das Ergebnis ist repräsentativ für mindestens 3 unabhängig voneinander durchgeführte Untersuchungen.

4.5 Migrationsassay

Die Migrationsfähigkeit der Zellen wurde mit Hilfe von Fibronectin-beschichteten Transwell-Einsätzen untersucht.

Es zeigte sich, dass die stabile Überexpression von C1199-Tiam1, Wildtyp-Rac3 und V12-Rac3 in den PC3-Zellen zu einer signifikanten Migrationssteigerung (jeweils $p < 0,001$) im Vergleich zu den mock-transfizierten PC3-Zellen führte, während Vollängen-Tiam1 die Migration nicht beeinflusste (Abbildung 12).

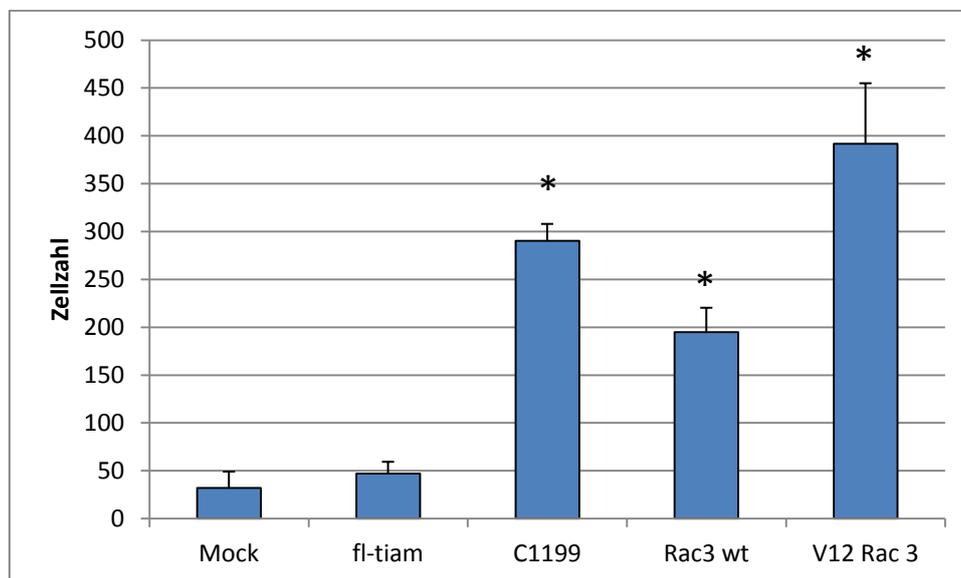


Abbildung 12: Migration in Fibronectin-beschichteten Transwell-Einsätzen. Die PC3-Zellen wurden stabil mit dem leeren Vektor (mock), Vollängen (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3V12) transfiziert. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 6 Messwerten aus einem Versuchsansatz (*, $p < 0,001$). Das Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Untersuchungen.

4.6 Invasionsassay

Nachdem der Tiam1/ Rac-Signalweg in der Vergangenheit in verschiedenen Zellsystemen unterschiedliche Effekte auf die Invasionsfähigkeit von Tumorzellen gezeigt hat, wurde auch in den PC3-Zellen der Einfluss auf die Invasivität der Zellen mittels Matrigel-Invasionsassay im Transwell-System untersucht. Dabei führte die Überexpression von Vollängen-Tiam1,

C1199-Tiam1, Wildtyp-Rac3 und V12-Rac3 in den PC3-Zellen jeweils zu einer im Vergleich mit dem leeren Vektor signifikanten Steigerung der Invasivität (jeweils $p < 0,001$). Den deutlichsten Effekt zeigten dabei die C1199-Tiam1 transfizierten Zellen.

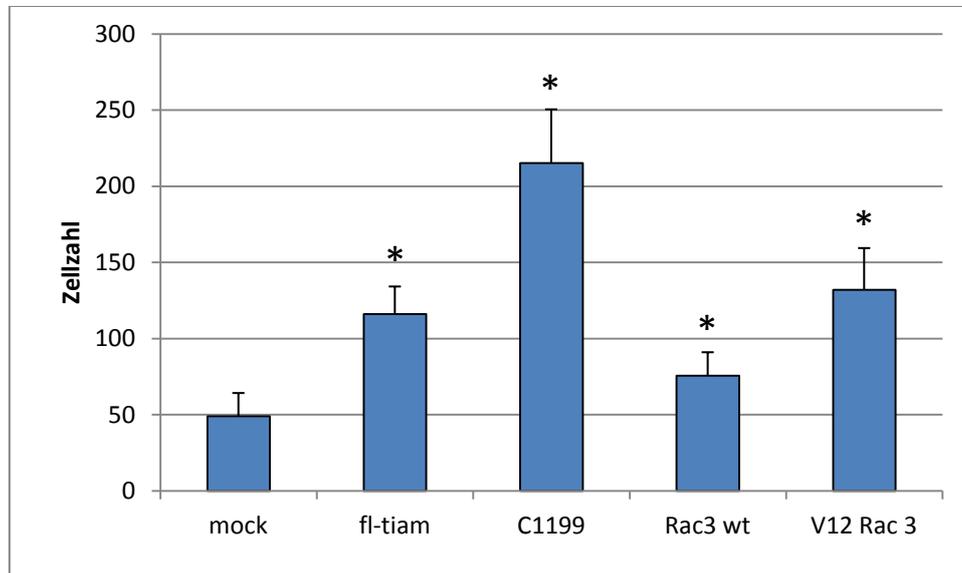


Abbildung 13: Invasionsassay in Matrigel-beschichteten Transwell-Einsätzen. Die PC3-Zellen wurden stabil mit dem leeren Vektor (mock), Vollängen Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3V12) transfiziert. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 24 Messwerten aus einem Versuchsansatz (*, $p < 0,001$). Das Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Untersuchungen.

4.7 Nachweis von TIMPs und MMPs

In einer früheren Arbeit (Engers R., 2001) an der Nierenzellkarzinom-Zelllinie „clearCa-28“ konnte gezeigt werden, dass C1199-Tiam1 und V12 Rac1 eine Invasionshemmung induzieren und diese unter anderem durch eine Hochregulation der TIMPs vermittelt wurde. Die MMPs, waren dabei weder in ihrer Sekretion noch in ihrer Aktivierung verändert.

Dieser Zusammenhang sollte auch in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Dabei zeigte sich in den Zymographien eine konstante Vermehrung der Pro-MMP9 in den C1199-Tiam1-transfizierten PC3-Zellen (vgl. Abbildung 14). In den Vollängen-Tiam1- sowie den V12-Rac3-transfizierten PC3-Zellen fand sich hingegen eine deutlich verminderte Pro-MMP9-Sekretion. Im Gegensatz hierzu wurde die Sekretion der aktiven MMP9 nicht beeinflusst.

In der Betrachtung der kleineren MMP2 und ihrer Pro-Form zeigten die Zymographien keine eindeutigen und reproduzierbaren Unterschiede zwischen den stabil mit den einzelnen Konstrukten transfizierten PC3-Zellen.

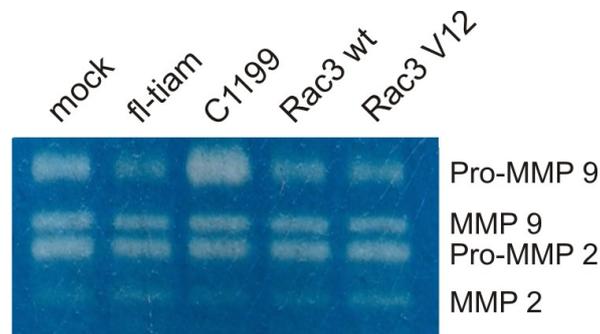


Abbildung 14: Zymographie zum Nachweis der Matrix-Metalloproteinasen in stabil mit leerem Vektor (mock), Volllängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierten PC3-Zellen. Die Banden der MMP9 stellen sich bei ca. 92 kDa, die der MMP2 bei ca. 72 kDa dar. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Zum Nachweis der TIMPs wurde eine Western-Blot-Analyse aus den Zellkulturüberständen durchgeführt. Für TIMP1 zeigte sich eine konstante Herunterregulation der Sekretion in den mit C1199-Tiam1- und V12-Rac3-transfizierten PC3-Zellen, verglichen mit dem leeren Vektor (Abbildung 15). Bei den mit Volllängen-Tiam1 und Wildtyp-Rac3 transfizierten Zellen fand sich in einigen Versuchen zwar eine schwache Herunterregulation der TIMP1-Sekretion, dieser Effekt war jedoch nicht konstant reproduzierbar.

Da bei Verwendung eines Zellkulturüberstandes kein Produkt eines *housekeeping*-Gens nachgewiesen werden kann, erfolgte die Kontrolle des Proteinauftrags auf die Membran anhand der Ponceau-Färbung.

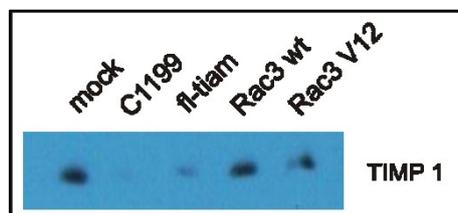


Abbildung 15: Western Blot für TIMP1 aus 24h-Zellkulturüberständen der stabil mit leerem Vektor (mock), C1199-Tiam1 (C1199), Volllängen-Tiam1 (fl-tiam), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierten PC3-Zellen. Die Bande von TIMP1 konnte bei ca. 28kDa detektiert werden. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Auch für den Nachweis der TIMP2-Sekretion aus den Zellkulturüberständen zeigte sich eine konstante Herunterregulation in den mit C1199-Tiam1- und V12-Rac3-transfizierten PC3-Zellen, verglichen mit dem leeren Vektor (Abbildung 16). Die mit Vollängen-Tiam1 und Wildtyp-Rac3 transfizierten Zellen zeigten hingegen keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der TIMP2-Sekretion verglichen mit den mock-transfizierten Zellen.

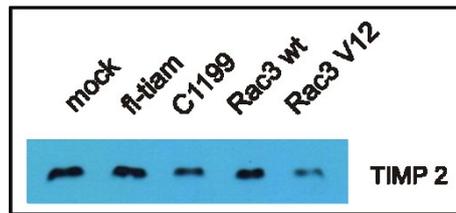


Abbildung 16: Western Blot für TIMP2 aus 24h-Zellkulturüberständen der stabil mit leerem Vektor (mock), Vollängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierten PC3-Zellen. Die Bande von TIMP2 konnte bei ca. 21 kDa detektiert werden. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.8 Zellproliferation

Es ist bekannt, dass Tumorzellen eine Fehlregulation ihres Wachstums zeigen. In diesem Zusammenhang sollte die Frage untersucht werden, ob in den PC3-Zellen ein unterschiedlicher Einfluss von Tiam1 oder Rac3 auf die Zellproliferation beobachtet werden kann. Ein weiterer Aspekt dieses Versuchs war es, zu untersuchen, ob die Ergebnisse des Invasionsassays, der über 24 Stunden durchgeführt wurde, durch eine schnellere Zellproliferation einzelner Zelllinien verfälscht werden könnten. Mit Hilfe des XTT-Proliferationsassays wurde eine Wachstumskurve für alle stabil transfizierten Zelllinien erstellt.

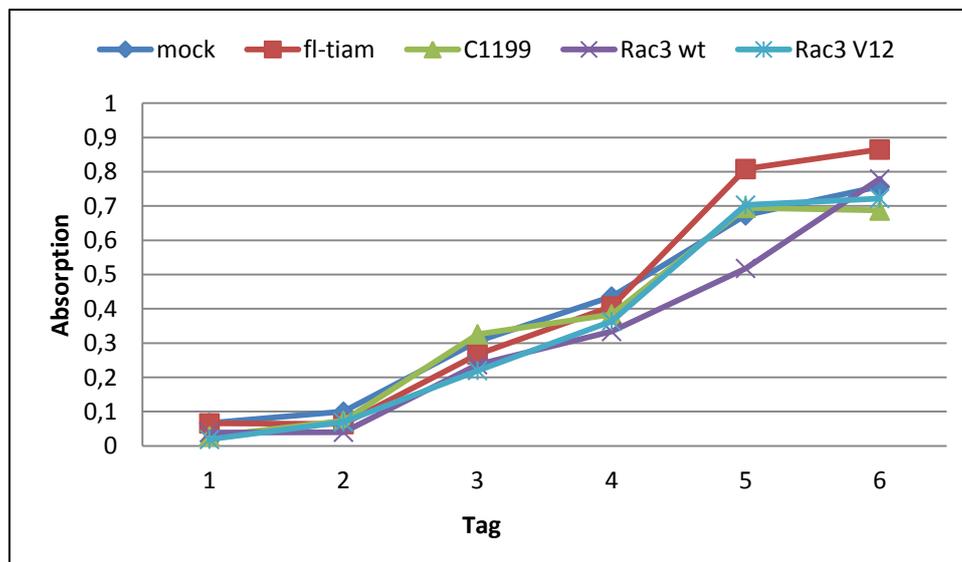


Abbildung 17: Wachstumskurven im XTT-Proliferationsassay der stabil mit leerem Vektor (mock), Vollängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierten PC3-Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte der Absorption von 6 Messwerten aus einem Versuchsansatz. Das Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Untersuchungen.

Im XTT-Proliferationsassay (Abbildung 17) zeigte sich das typische Wachstumsverhalten von Zellen in der Zellkultur: Am Beginn stand eine Latenzphase (zwischen Tag 1 und 2), die in eine Beschleunigungsphase überging. Es folgte eine exponentielle Wachstumsphase mit maximaler Zellproliferation (zwischen Tag 4 und Tag 5) und dann ein limitiertes Wachstum und der Übergang in eine stationäre Phase (ab Tag 5).

Dabei zeigten sich nur geringe Unterschiede im Wachstumsverhalten der stabil mit leerem Vektor (mock), Volllängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierten PC3-Zellen. Bis zum vierten Tag verliefen die Wachstumskurven der verschiedenen transfizierten Zelllinien ungefähr identisch. Somit ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse im Matrigel-Invasionsassay nicht durch Unterschiede im Proliferationsverhalten der verschiedenen Zelllinien beeinflusst wurden.

Die Wachstumskurven der mock-, Volllängen-Tiam1-, C1199-Tiam1- und V12-Rac3-transfizierten Zellen zeigten das größte Steigungsmaß und damit die geringste Zellverdopplungszeit zwischen Tag vier und fünf, während die Rac3-Wildtyp-transfizierten Zellen das größte Steigungsmaß zwischen Tag fünf und Tag sechs zeigten.

Um eine genauere Aussage über das maximale Steigungsmaß der Wachstumskurven der verschiedenen Zelllinien zu erhalten, wurde dieses für alle Zelllinien in allen drei Versuchen ausgerechnet und ein Mittelwert sowie eine Standardabweichung aus den drei Versuchsergebnissen gebildet. Dabei zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abbildung 18).

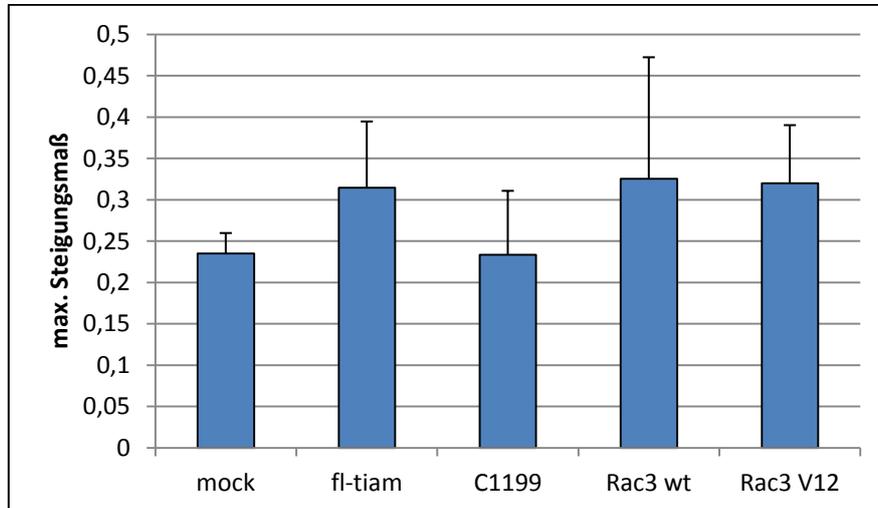


Abbildung 18: Maximales Steigungsmaß der stabil mit leerem Vektor (mock), Volllängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierten PC3-Zellen im XTT-Proliferationsassay. Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unterschiedlichen Versuchen.

4.9 Identifikation nachgeschalteter Signalwege

4.9.1 Nuclear factor kappa B (NFκB)

NFκB reguliert als Transkriptionsfaktor anti-apoptotische Gene, vor allem auch Gene der Zellzykluskontrolle und steht im Zusammenhang mit Immunantwort und Entzündungsreaktionen (Cammarano M.S., 2001). In HeLa-Zellen fand man, dass V12 Rac1 die DNA-Bindung und die Transkriptionsaktivität von NFκB erhöhen kann und dass Rac-Proteine notwendig sind für den Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration nach Zytokin-Stimulation (Sulciner D.J., 1996).

In den Western-Blot-Analysen der stabil transfizierten PC3-Zellen zeigte sich eine konstante und deutlich stärkere Expression von NFκB in den C1199-Tiam1-transfizierten Zellen verglichen mit mock-transfizierten Kontrollzellen, während Wildtyp-Rac3 keine Effekte induzierte (Abbildung 19). In einigen Western-Blot-Analysen zeigten auch die mit Vollängen-Tiam1-transfizierten Zellen eine leicht gesteigerte NFκB-Expression und die mit V12-Rac3-transfizierten PC3-Zellen eine verminderte Expression von NFκB. Diese Effekte waren jedoch nicht konstant reproduzierbar.

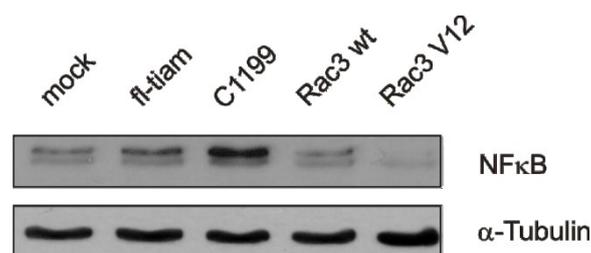


Abbildung 19: Western Blot mit Proteinlysaten stabil mit leerem Vektor (mock), Vollängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierter PC3-Zellen. Es wurde eine Antikörperinkubation mit anti-NFκB und anschließend eine Reinkubation der Membran mit anti-α-Tubulin durchgeführt. Die Banden des NFκB-Signals erscheinen bei ca. 65 kDa, die Banden des α-Tubulins bei ca. 50kDa. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.9.2 Cyclin D1

Cyclin D1 ist als regulatorische Untereinheit unter anderem an der Phosphorylierung und damit der Inaktivierung des Zellzyklus-inhibierenden Retinoblastomproteins beteiligt (Fu M., 2004). Rac kann sowohl über eine NF κ B-Aktivierung als auch parallel zum NF κ B-Signalweg die Transkription von Cyclin D1 in murinen embryonalen Fibroblasten stimulieren (Klein E.A., 2007).

In sechs unabhängig voneinander durchgeführten Western-Blot-Analysen mit Lysaten der unterschiedlich transfizierten PC3-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Cyclin D1-Expression auf Proteinebene (Abbildung 20).

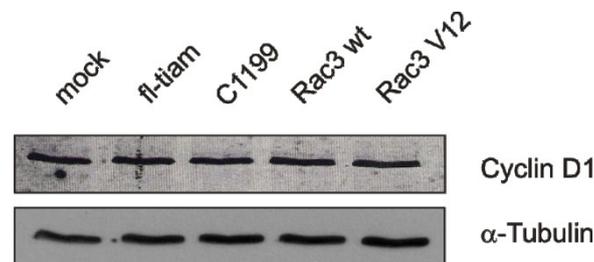


Abbildung 20: Western Blot mit Proteinlysaten stabil mit leerem Vektor (mock), Volllängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierter PC3-Zellen. Es wurde eine Antikörperinkubation mit anti-Cyclin D1 und anschließend eine Reinkubation der Membran mit anti- α -Tubulin durchgeführt. Die Banden des Cyclin D1-Signals erscheinen bei ca. 40 kDa, die Banden des α -Tubulins bei ca. 50kDa. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens sechs unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.9.3 Akt

Zur Untersuchung der für Rac beschriebenen Zell-Signalwege, die durch Phosphorylierung aktiviert werden, wurden Phospho Blots durchgeführt.

Eines dieser Signalmoleküle ist die Akt-Kinase. Phosphoryliertes Akt vermittelt die Phosphorylierung vieler weiterer Proteine, die Zellwachstum, Zellüberleben und Zellteilung induzieren können (Cantley L.C., 2002). Beim Prostatakarzinom ist die Akt-Kinaseaktivität oft erhöht, was mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Sun M., 2001).

In den Phospho Blots für Akt zeigten Volllängen-Tiam1, C1199-Tiam1, Wildtyp-Rac3 und V12-Rac3 in sieben unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten jedoch keine eindeutigen und reproduzierbaren Effekte (Abbildung 21).

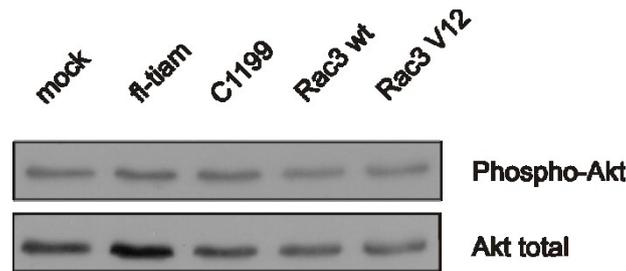


Abbildung 21: Phospho Blot mit speziell aufbereiteten Proteinlysaten aus stabil mit leerem Vektor (mock), Vollängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierten PC3-Zellen. Die Bande des phosphorylierten Akts lässt sich bei ca. 60 kDa detektieren. Zum Vergleich der Proteinladung wurde die Membran nach Detektion mit dem Phospho-Antikörper gestrippt und eine Detektion mit dem Antikörper gegen phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes Akt durchgeführt (Akt total). Dieser Western-Blot ist repräsentativ für sieben unabhängig voneinander durchgeführte Western-Blot-Untersuchungen.

4.9.4 c-JUN NH₂-terminale Kinase

Die c-JUN NH₂-terminale Kinase gehört zu den MAP-Kinasen. Schon früh wurde gezeigt, dass sie in COS7- und NIH3T3-Zellen durch Tiam1 abhängig von Rac aktiviert wird (Michiels F., 1997). Die JUN-Kinase bindet und phosphoryliert das DNA-bindende Protein c-Jun, welches eine wichtige Komponente des AP-1-Transkriptionskomplexes ist. Der Signalweg kann durch Stress, Bestrahlung und Wachstumsfaktoren aktiviert werden und ist Apoptose-relevant (Johnson G.L., 2002).

In fünf unabhängig voneinander durchgeführten Western-Blot-Analysen mit Lysaten der unterschiedlich transfizierten PC3-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung der JUN-Kinase (Abbildung 22). Die abgebildeten Doppelbanden entsprechen JUN-Kinase-Isoformen, die durch alternatives Spleißen der Transkripte der JUN 1-3 Gene entstehen (Gupta S., 1996). Sie sind zwischen 35 und 55 kDa zu detektieren.

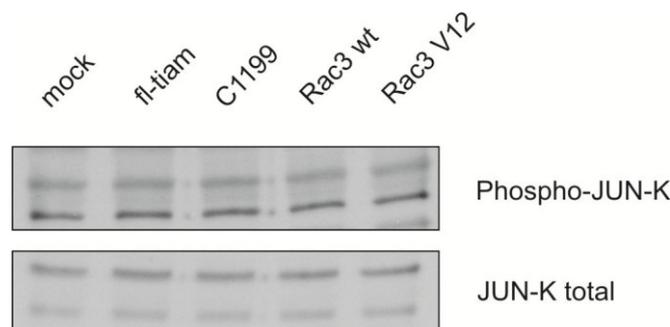


Abbildung 22: Phospho Blot mit speziell aufbereiteten Proteinlysaten aus stabil mit leerem Vektor (mock), Vollängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierten PC3-Zellen. Die Banden der verschiedenen JUN-Kinase-Spleißvarianten lassen sich zwischen 46 und 52 kDa detektieren. Zum Vergleich der Proteinbeladung wurde die Membran nach Detektion mit dem Phospho-Antikörper gestrippt und eine Detektion mit dem Antikörper gegen phosphorylierte und nicht-phosphorylierte JUN-Kinase durchgeführt (JUN-K total). Dieser Western-Blot ist repräsentativ für fünf unabhängig voneinander durchgeführte Western-Blot-Untersuchungen.

4.9.5 ERK-Kinase

Die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK) werden zur Regulierung von Meiose, Mitose und postmitotischen Funktionen in differenzierten Zellen benötigt. Sie können durch viele verschiedene Stimuli und Signalwege aktiviert werden. ERK kann über Ras eine erhöhten Proliferationsrate in Tumoren bewirken (Johnson G.L., 2002).

In Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass ohne Stimulation durch Wachstumsfaktoren, das Überleben der Keratinozyten von einer Tiam1-vermittelten ERK-Aktivierung abhängt, die durch die Beeinflussung der intrazellulären ROS-Konzentration reguliert wird und abhängig von Zell-Matrix-Adhäsion ist (Rygiel T.P., 2008).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich für die stabil transfizierten PC3-Zellen jedoch in fünf unabhängig voneinander durchgeführten Western-Blot-Analysen keine Unterschiede in der Phosphorylierung der ERK-Kinasen (Abbildung 23).

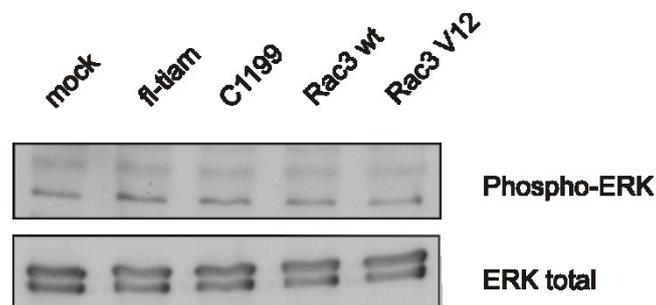


Abbildung 23: Phospho Blot mit speziell aufbereiteten Proteinlysaten aus stabil mit leerem Vektor (mock), Vollängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierten PC3-Zellen. Die Banden der beiden verschiedenen ERK-Isoformen 1 und 2 lassen sich zwischen 35 und 55 kDa detektieren. Zum Vergleich der Proteinbeladung wurde die Membran nach Detektion mit dem Phospho-Antikörper gestrippt und eine Detektion mit dem Antikörper gegen phosphorylierte und nicht-phosphorylierte ERK-Kinasen durchgeführt (ERK total). Dieser Western-Blot ist repräsentativ für fünf unabhängig voneinander durchgeführte Western-Blot-Untersuchungen.

4.9.6 P38- Kinase

Die p38-Kinase gehört wie die JUN- und die ERK-Kinasen zur Gruppe der MAP-Kinasen und ist in den verschiedensten Zellen an multiplen Signaltransduktionswegen beteiligt.

Abhängig von Zelltyp und Stimulus kann die p38 MAP-Kinase sowohl pro- als auch anti-apoptische Funktionen haben. Nach Stimulation mit TNF- α , TGF- β oder als Antwort auf

oxidativen Stress kann über den p38-Signalweg Apoptose vermittelt werden (Lenassi M., 2006).

In sechs unabhängig voneinander durchgeführten Western-Blot-Analyse mit Lysaten der unterschiedlich transfizierten PC3-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung der p38-Kinase (Abbildung 24). Die im abgebildeten Phospho Blot angedeuteten geringgradigen Intensitätsunterschiede in der Phosphorylierung von C1199-Tiam1- sowie V12-Rac3- transfizierten PC3-Zellen im Vergleich zur mock transfizierten Kontrolle ließen sich in den übrigen Experimenten nicht reproduzieren.

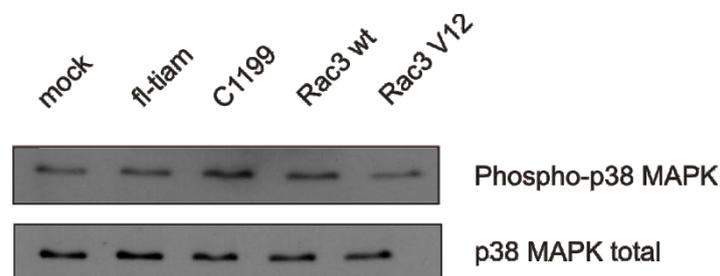


Abbildung 24: Phospho Blot mit speziell aufbereiteten Proteinlysaten aus stabil mit leerem Vektor (mock), Vollängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierten PC3-Zellen. Die Banden lassen sich bei ca. 38 kDa detektieren. Zum Vergleich der Proteinbeladung wurde die Membran nach Detektion mit dem Phospho-Antikörper gestriipt und eine Detektion mit dem Antikörper gegen phosphorylierte und nicht-phosphorylierte p38-Kinase durchgeführt (p38 MAPK total). Dieser Western-Blot ist repräsentativ für sechs unabhängig voneinander durchgeführte Western-Blot-Untersuchungen.

4.9.7 70 kDa-ribosomale-S6-Kinase

Die p70S6-Kinase beeinflusst über eine Phosphorylierung des Ribosomenkomplexes die Translation der mRNA. Sie wird unter anderem von Rac aktiviert und kann über ein Scaffold-Protein an Tiam1 gebunden werden (Berven L.A., 2000; Buchsbaum R.J., 2003).

In fünf unabhängig voneinander durchgeführten Western-Blot-Analysen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Phosphorylierung der p70S6-Kinase zwischen den mit den mit mock-, Vollängen-Tiam1, C1199-Tiam1, Wildtyp- und V12-Rac3-transfizierten PC3-Zellen.

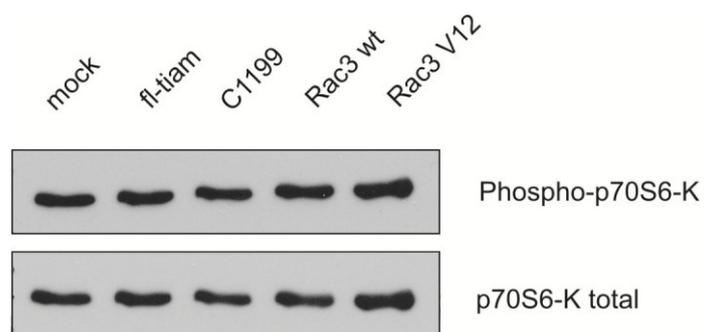


Abbildung 25: Phospho Blot mit speziell aufbereiteten Proteinlysaten aus stabil mit leerem Vektor (mock), Vollängen-Tiam1 (fl-tiam), C1199-Tiam1 (C1199), Wildtyp-Rac3 (Rac3 wt) oder V12-Rac3 (Rac3 V12) transfizierten PC3-Zellen. Die Banden lassen sich zwischen 55 und 70 kDa detektieren. Zum Vergleich der Proteinbeladung wurde die Membran nach Detektion mit dem Phospho-Antikörper gestrippt und eine Detektion mit dem Antikörper gegen phosphorylierte und nicht-phosphorylierte p70S6-Kinase durchgeführt (p70S6-K total). Dieser Western-Blot ist repräsentativ für fünf unabhängig voneinander durchgeführte Western-Blot-Untersuchungen.

5 Diskussion

5.1 Funktionelle Relevanz des Tiam1/Rac3-Signalwegs

Welche funktionelle Relevanz hat der Tiam1/Rac3-Signalweg in Bezug auf Zelladhäsion, Proliferation, Migration und Invasion des Prostatakarzinoms?

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte durch semiquantitative Immunhistochemie des Prostatagewebes von 60 R0-resezierten Prostatakarzinom-Patienten gezeigt werden, dass bei 95% dieser Prostatakarzinome eine signifikant höhere Tiam1-Expression, verglichen mit dem normalem sekretorischen Epithel der Prostata, vorlag. Zudem wurde nachgewiesen, dass eine hohe Tiam1-Expression in der semiquantitativen Immunhistochemie (mehr als 3,5 fach, verglichen mit dem normalen sekretorischen Epithel) in Prostatakarzinom-Gewebe signifikant mit einer erhöhten Rezidiv-Wahrscheinlichkeit, Lymphgefäß-Invasion und hohem Gleason-Score assoziiert war (Engers R., 2006 a).

Da Tiam1 eine spezifischer Aktivator der kleinen GTPase Rac ist (Michiels F., 1995), wurde am selben Patientenkollektiv auch die Rac-Expression mittels semiquantitativer Immunhistochemie untersucht. Auch hier zeigte sich, dass im Prostatakarzinomgewebe sowie in der hochgradigen, prostatichen intraepithelialen Neoplasie die Expression von Rac, verglichen mit dem normalem sekretorischen Epithel der Prostata, signifikant erhöht war. Diese Erhöhung wurde auf RNA- und Proteinebene anhand von kryokonservierten Prostatakarzinomgeweben bestätigt und einer verstärkten Expression der Rac3-Isoform zugeordnet. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Rac im Prostatakarzinom signifikant mit einer perineuralen Invasion, einem hohen Gleason-Score und einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert war. Zudem war eine verstärkte Rac-Expression signifikant mit einer verstärkten Tiam1-Expression korreliert (Engers R., 2007).

Nachdem diese Vorergebnisse gezeigt haben, dass der Tiam1 und der Rac3- Expression im Prostatakarzinom *in vivo* eine große Bedeutung zukommt und die erhöhte Expression bereits nur einer der beiden Proteine als unabhängiger Prognosemarker für ein verkürztes Rezidiv-freies Überleben herangezogen werden kann (Engers R., 2006 a) (Engers R., 2007), stellte sich die Frage, welche funktionelle Relevanz die Überexpression von Tiam1 und Rac3 im Prostatakarzinom besitzt.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde die humane Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 stabil mit dem retroviralen Vektor pLZRS-Ires oder mit den in diesen Vektor klonierten cDNAs von Vollängen-Tiam1, C1199-Tiam1, Rac3-Wildtyp oder V12-Rac3 transfiziert.

Die erfolgreiche Expression der entsprechenden Proteine wurde mittels Western-Blot-Analyse verifiziert.

Morphologisch führte die Transfektion von Vollängen- und C1199-Tiam1 zu einer Änderung der Zellmorphologie in den transfizierten PC3-Zellen. Diese zeigten einen deutlichen „Pfannkuchen-artigen“ Phänotyp sowie das typische *membrane-ruffling*. Die Rac3-transfizierten Zellen zeigten keine Änderung des Phänotyps.

In der Literatur wurde schon früh eine Änderung der Zellmorphologie in Swiss 3T3-Zellen nach Mikroinjektion von V12 Rac1 beschrieben (Ridley A. J., 1992 b). Ebenfalls konnte in NIH3T3-Zellen gezeigt werden, dass auch transient mit Tiam1- oder N-terminal trunziertem Tiam1-transfizierte Zellen einen ähnlichen Phänotyp mit deutlichem *membrane-ruffling* zeigten. Dieser zeigte sich in ca. 80% der Tiam1-transfizierten embryonalen, murinen Fibroblasten (Michiels F., 1995).

Dass die Rac3-transfizierten PC3-Zellen in den vorliegenden Untersuchungen keine Unterschiede im Zellphänotyp zeigen, könnte drei Ursachen haben: Die Transfektionsart, die Kultivierung der Zellen und die unterschiedliche Lokalisation der Rac-Isoformen.

Bei der Transfektionsart kann von Bedeutung sein, dass die PC3-Zellen stabil transfiziert wurden und im Vergleich zu transient transfizierten Zellen nur moderate Level der jeweils überexprimierten Proteine aufweisen. In der Literatur (Leeuwen F.N., 1997) wurde beschrieben, dass C1199-Tiam1-überexprimierende Zellen in stabil transfizierten Zellen einen weniger extremen Phänotyp als in transient transfizierten Zellen zeigen.

Als weitere Möglichkeit kommt in Betracht, dass die Kultivierung der Zellen auf unbeschichtetem Plastik in den Zellkulturschalen einen Einfluss auf den Phänotyp hat, da für die verschiedenen zellulären Funktionen von Tiam1 und Rac eine eindeutige Substratabhängigkeit beschrieben wurde (Sander E.E., 1998)

Außerdem könnte die Diskrepanz der im Rahmen dieser Arbeit für Rac3 beobachteten und in der Literatur für Rac1-beschriebenen Auswirkungen auf den Zellphänotyp durch eine unterschiedliche Lokalisation der Rac-Isoformen innerhalb der Zelle erklärt werden. Tatsächlich wurden für die beiden Rac-Isoformen bisher teils gegenteilige Effekte auf die Zellmorphologie beschrieben (Hajdo-Milasinovic A., 2007). Während eine Überexpression von Wildtyp-

Rac3 in einer Neuroblastom-Zelllinie eine Abrundung der Zellen induzierte, führte die Überexpression von Wildtyp Rac1 zu einer Ausbildung von Neuriten-artigen Zellausläufer. Dabei wurden die unterschiedlichen Effekte der Rac-Isoformen auf die Zellmorphologie unter anderem durch die unterschiedlichen Lokalisationen von Rac1 und Rac3 erklärt, da Rac1 eher in der Plasmamembran und in Zellfortsätzen und Rac3 vorwiegend perinukleär lokalisiert war (Hajdo-Milasinovic A., 2007).

Neben den morphologischen Veränderungen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die funktionellen Unterschiede zwischen den Vollängen-Tiam1-, C1199-Tiam1-, Wildtyp-Rac3- oder V12-Rac3-transfizierten Zellen im Hinblick auf verschiedene Metastasierungs-relevante Eigenschaften untersucht. Dazu wurden in *in-vitro* Funktionsassays verschiedene Schritte der Metastasierungskaskade nachgestellt, zu denen unter anderem auch die Zell-Substrat und die Zell-Zelladhäsion gehörten.

In Bezug auf die Zell-Substrat-Adhäsion zeigte sich eine signifikante Steigerung der Adhäsion an Laminin bei den stabil mit Vollängen-Tiam1-, C1199-Tiam1- oder V12-Rac3-transfizierten PC3-Zellen im Vergleich zu den mock-transfizierten Zellen, während Wildtyp-Rac3 keine signifikanten Effekte induzierte.

Die Bindung an Laminin wird vor allem über die $\alpha 6$ -Integrine vermittelt. In der Literatur (Leeuwen F.N., 1997) konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von C1199-Tiam1 in einer Neuroblastomzelllinie über eine konsekutive Rac1-Aktivierung die Adhäsion an Laminin induzierte. Dies wurde über die, in Tiam1-transfizierten Zellen verstärkte und spezifische Formation $\alpha 6\beta 1$ -enthaltender Adhäsionskomplexe in der Zellperipherie vermittelt (Leeuwen F.N., 1997). Gleichzeitig entwickelten die Tiam1-transfizierten Zellen in den ersten Stunden der Kultivierung in Laminin-beschichteten Zellkulturschalen eine Zellpolarisation, bei der sich bei einigen der Zellen ein *leading edge* an einem Zellpol und ein *trailing edge* am anderen Zellpol ausbildete (Leeuwen F.N., 1997). Die Ausbildung eines *leading* und eines *trailing edge* deutet darauf hin, dass die Formation der Tiam1/Rac1-induzierten $\alpha 6\beta 1$ -enthaltenden Adhäsionskomplexe auf Laminin eine erhöhte Zellmigration induzieren kann.

Pathophysiologisch könnte dieser Zusammenhang bei der perineuralen Invasion von Bedeutung sein, da bei dieser Invasionsart eine Migration der Tumorzellen entlang der Lamininreichen Matrix peripherer Nerven stattfindet. Für das Prostatakarzinom wurde ein derartiger Zusammenhang zwischen $\alpha 6$ -Integrinen und der perineuralen Invasion des Prostatakarzinoms wurde bereits durch Sroka et al. erläutert (Sroka I.C., 2010).

In Bezug auf die Zell-Zell-Adhäsion zeigte sich in der Immunfluoreszenz eine verminderte Adhärenz der Volllängen-Tiam1-, C1199-Tiam1-, Wildtyp-Rac3 oder V12-Rac3-transfizierten PC3-Zellen verglichen mit den mock-transfizierten Zellen.

Da eine reduzierte Zell-Zelladhäsion Zeichen eines Differenzierungsverlustes und einer gesteigerten Zellmotilität ist (Engers R., 2000), sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Transfektion von Volllängen- und C1199-Tiam1 ebenso wie Wildtyp- und V12-Rac3 in den PC3-Zellen zu einem aggressiveren biologischen Verhalten führen könnte. Wie die reduzierte Zell-Zelladhäsion in PC3-Zellen durch Tiam1 und Rac3 vermittelt wird, ist bislang nicht bekannt. Denkbar wäre unter anderem eine Expressionshemmung von E-Cadherin. Da jedoch in der Literatur beschrieben (Davies G., 2000) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde, dass E-Cadherin in PC3-Zellen nicht exprimiert ist, kann dieser Mechanismus für das vorliegende Zellsystem ausgeschlossen werden.

Im Rahmen der weiteren *in-vitro* Funktionsassays wurde neben der Zelladhäsion auch die Migrationsfähigkeit der Zellen mit Hilfe von Fibronectin-beschichteten Transwell-Einsätzen untersucht. Dabei führte die stabile Überexpression von C1199-Tiam1, Rac3-Wildtyp und V12-Rac3 in PC3-Zellen zu einer hoch signifikanten Migrationssteigerung (jeweils $p \leq 0,001$) im Vergleich zu den mock-transfizierten Zellen. Auch die Matrigel-Invasivität der PC3-Zellen wurde durch stabile Überexpression von Volllängen- bzw. C1199-Tiam1, Wildtyp- oder V12-Rac3 im Vergleich zur mock-transfizierten Kontrolle signifikant induziert (jeweils $p \leq 0,001$).

Eine Steigerung der Zellmigration und -invasion nach Überexpression von Tiam1 und Rac1 wurde schon früher in verschiedenen Tumorzelllinien beschrieben: so beispielsweise durch Keely et al. beim Mammakarzinom (Keely P.J., 1997), durch Minard et al. beim Kolonkarzinom (Minard M.E., 2006) und auch in jüngerer Zeit für einige weitere Karzinome, beispielsweise das Magenkarzinom (Shi Y.L., 2013). In anderen Zellsystemen kann eine Tiam1 oder Rac1-Überexpression jedoch auch eine Migrations- und Invasionshemmung induzieren. Dies konnte in einer humanen Nierenkarzinomzelllinie (Engers R., 2001) und in MDCK-Zellen gezeigt werden (Hordijk P.L., 1997).

Ob es zu einer Hemmung oder Steigerung von Migration und Invasion kommt, hängt erstens von der Möglichkeit der Etablierung E-Cadherin-basierter Zelladhäsionskomplexe, zweitens von dem Substrat, auf dem die Tumorzellen kultiviert werden und drittens von den Eigenschaften der Tumorzellen selber ab (Sander E.E., 1998).

Dabei stehen auf der einen Seite die vom Substrat abhängigen, Rac-regulierten migrationssteigernden Effekte, die durch spezielle Eigenschaften der Tumorzellen wie etwa die Integrin-Expression beeinflusst werden und auf der anderen Seite die E-Cadherin-basierten Zell-Zell-Kontakte, die eine starke Hemmung der Migration bewirken können.

Wie bereits erwähnt wurde, exprimieren die PC3-Zellen aber keine E-Cadherine (Davies G., 2000). Damit lässt sich eine stärkere Migration und Invasion bereits durch einen Mangel an E-Cadherin erklären, da ein wesentlicher Mechanismus über den der Tiam1/Rac-Signalweg eine Hemmung von Migration und Invasion bewirken kann -die Stabilisierung E-Cadherin-basierter Zell-Zell-Kontakte- hier fehlt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem Proliferationsanalysen durchgeführt. Die Proliferation der transfizierten Zellen wurde dabei unter zwei Gesichtspunkten untersucht. Erstens waren in der Literatur bereits Effekte von Rac3 auf die Zellproliferation beschrieben worden (Mira J.P., 2000) und zweitens sollte untersucht werden, ob eine unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeit gegebenenfalls die Effekte in den Funktionsanalysen verfälschen könnte. Dabei ließen sich in den durchgeführten XTT-Proliferationsassays keine signifikanten Unterschiede durch Überexpression von Vollängen- oder C1199-Tiam1, Wildtyp- oder V12-Rac3 auf die Zellproliferation der PC3-Zellen feststellen. Passend zu diesen Ergebnissen zeigte auch die Expression von Cyclin D1 als Zellzyklus-regulierendes Protein keinen Unterschied zwischen den verschieden transfizierten PC3-Zellen. Durch die gleichartige Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen konnten auch Effekte einer unterschiedlichen Zellproliferation auf die *in-vitro* Funktionsanalysen ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend führen in PC3-Zellen sowohl die Aktivierung von Tiam1 als auch die Aktivierung von Rac3 zu einer signifikanten Steigerung der Zelladhäsion an Laminin, der Zellmigration und der Matrigel-Invasion ohne jedoch die Zellproliferation nennenswert zu beeinflussen. Da Tiam1 bekanntermaßen Rac3 aktiviert, liegt nahe anzunehmen, dass die Effekte von Tiam1 in PC3-Zellen durch Rac3 vermittelt werden. Zwar wird auch Rac1 als weiterer Effektor von Tiam1 im Prostatakarzinom exprimiert, doch konnte gezeigt werden, dass die gegenüber dem Normalgewebe gesteigerte Expression von Rac im Prostatakarzinom im Wesentlichen auf einer Überexpression der Rac3-Isoform beruht (Engers R., 2007).

5.2 Sekretion von MMPs und TIMPs

Welche funktionelle Relevanz hat der Tiam1/Rac3-Signalweg in Bezug auf die Sekretion von Matrixmetalloproteinasen und ihren Inhibitoren den Tissue inhibitors of metalloproteinases?

In früheren Untersuchungen von Engers et al. (Engers R., 2001) war erstmals gezeigt worden, dass der Tiam1/Rac1-Signalweg das Invasionsverhalten humaner Nieren- und Kolonkarzinomzellen durch selektive Sekretionssteigerung von TIMP1 und TIMP2 inhibiert, während die Sekretion von MMP2 und MMP9 nicht beeinflusst wurde.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Effekte von Volllängen- und C1199-Tiam1 sowie Wildtyp- und V12-Rac3 auf die Sekretion von MMP2, MMP9, TIMP1 und TIMP2 analysiert. Dabei zeigte sich eine deutlich verminderte Sekretion von TIMP1 und TIMP2 in den mit C1199-Tiam1- und V12-Rac3-transfizierten PC3-Zellen, verglichen mit mock-transfizierten Zellen. Es ließ sich allerdings kein nennenswerter Unterschied in der Menge der aktivierten MMP2 oder -9 in den aufbereiteten Zellkulturüberständen der Zellen feststellen. Lediglich die Menge der Pro-MMP9 zeigte sich in den C1199-Tiam1 transfizierten PC3-Zellen vermehrt.

Die verminderte Sekretion der invasionshemmenden Proteinase TIMP1 und TIMP2 bei gleichbleibender Menge an invasionsfördernden MMP2 und MMP9 kann eine mögliche Ursache für die erhöhte Invasivität der C1199-Tiam1- und V12-Rac3-transfizierten PC3-Zellen sein. Auf der Suche nach möglichen Mechanismen für die Herunterregulation von TIMP1 und TIMP2 fand sich in der Literatur ein Zusammenhang mit dem NFκB-Signalweg.

Andela et al. (Andela V.B., 2000) hatten bereits im Jahr 2000 eine reziproke Regulation zwischen MMP9 und TIMP1 und TIMP2 mit Hochregulation von MMP9 und Herunterregulation von TIMP1 und TIMP2 durch Aktivierung des NFκB-Signalwegs in einer bronchoalveolären Karzinomzelllinie gefunden. 2003 konnten die Autoren diese reziproke Regulation auch in PC3-Zellen zeigen (Andela V.B., 2003). Passend dazu zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Aktivierung des NFκB-Signalwegs, die durch C1199-Tiam1 vermittelt wurde. Es lässt sich daraus folgern, dass C1199-Tiam1 in den PC3-Zellen über eine NFκB-Aktivierung eine Sekretionshemmung von TIMP1 und TIMP2 bewirkt. Diese Sekretions-

hemmung könnte eine Ursache für die erhöhte Invasivität der C1199-Tiam1-transfizierten PC3-Zellen sein.

In den Rac3-transfizierten PC3-Zellen zeigte sich jedoch kein Unterschied in der NFκB-Aktivierung. Hierfür kommen verschiedene Erklärungen in Frage: Zum einen wäre es möglich, dass in PC3-Zellen der NFκB-Signalweg nicht durch Rac3 aktiviert werden kann. Allerdings wurde in der Literatur in einem anderen Zellsystem eine Rac3-induzierte IκBα-Phosphorylierung und Degradation mit Aktivierung des NFκB-Signalwegs beschrieben (Gest C., 2013). Zum anderen könnte die Aktivierung zu schwach sein, um detektiert zu werden. Als eine Ursache hierfür käme zum Beispiel die verminderte Expressionstärke von V12-Rac3 in Betracht, die am ehesten durch die stabile Transfektion der Zellen bedingt ist.

Wenn Rac3 in den PC3-Zellen den NFκB-Signalweg tatsächlich nicht aktiviert, müsste man davon ausgehen, dass die von Tiam1 und Rac3 induzierte Invasionssteigerung nicht oder bei Tiam1 nur teilweise durch NFκB vermittelt wird. Dann könnte es sich bei der Invasionssteigerung durch Tiam1 um additive Effekte handeln bei denen neben einem Rac3-vermittelten Mechanismus zusätzlich eine Rac1-vermittelte NFκB-Aktivierung besteht.

Vor dem Hintergrund eines bereits in Nieren- und Kolonkarzinomzellen nachgewiesenen regulatorischen und invasionsrelevanten funktionellen Zusammenhangs zwischen Tiam1/Rac und TIMPs (Engers R., 2001), deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Tiam1-induzierte Invasionssteigerung von PC3-Zellen durch Aktivierung von Rac3 und konsekutiver Herabregulation von TIMP1 und TIMP2 vermittelt werden könnte.

5.3 Signalwege downstream von Tiam1/Rac3

Welche Signalmoleküle werden downstream des Tiam1/Rac3-Signalweges aktiviert?

Für Rac3 wurden bisher nur wenige spezifische Signalwege nachgewiesen. Da sich allerdings die Effektordomänen von Rac1 und Rac3 nicht unterscheiden, kann man davon ausgehen, dass prinzipiell beide Isoformen die für Rac1 beschriebenen Signalwege aktivieren können (Haataja L., 1997). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die für Rac1 beschriebenen Effektor-Signalwege hinsichtlich ihrer Aktivierung untersucht.

In der Expression von NF κ B ließ sich in den C1199-Tiam1 transfizierten PC3-Zellen ein signifikanter und reproduzierbarer Unterschied im Vergleich zu den mock transfizierten Zellen nachweisen, dessen Bedeutung bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert wurde.

In den durchgeführten Western Blot Untersuchungen zur Expression bzw. Phosphorylierung von Cyclin D1, den MAP-Kinasen JUN, ERK und p38, sowie Akt und der p70S6Kinase zeigte sich kein Unterschied zwischen den stabil mit Vollängen-Tiam1-, C1199-Tiam1-, Wildtyp-Rac3- oder V12-Rac3-transfizierten PC3-Zellen im Vergleich zu mock-transfizierten Kontrollzellen.

Da in anderen Zellsystemen eine Aktivierung der jeweiligen Effektormoleküle durch den Tiam1/Rac1-Signalweg beschrieben wurde und man aufgrund der Sequenzhomologie in den Effektordomänen davon ausgehen kann, dass Rac3 zumindest teilweise ähnliche Signalwege aktiviert wie Rac1, stellte sich die Frage, warum in den PC3 Zellen keine Aktivierung dieser Signalwege zu finden war.

Als Ursache hierfür können beispielsweise Zelllinien-spezifische Effekte oder die Transfektionsart in Betracht kommen. Die Zelllinien-spezifische Aktivierung verschiedener Signalwege wurde für Rac1 in der Literatur beschrieben. So aktiviert Rac1 in COS und HeLa-Zellen den JUN-Kinase- und p38-Kinase-Signalweg, kann aber ERK nicht aktivieren (Minden A., 1995), während in der Nierenzellkarzinom-Zelllinie im Gegensatz dazu ERK durch Rac1 aktiviert wird, dagegen aber nicht die JUN- und p38-Kinase (Engers R., 2006 b). Ähnliches konnte auch für Rac3 in verschiedenen Brustkrebszelllinien gezeigt werden. In MDA MB 231- und MCF-7-Zellen wird der ERK-Signalweg durch Rac3 aktiviert (Gest C., 2013), während in MDA MB 435-Zellen zwar die JUN-Kinase nicht aber die p38- oder ERK-Kinase aktiviert werden (Mira J.P., 2000).

Neben Zelllinien-spezifischen Effekten kann auch hier die Transfektionsart von Bedeutung sein. Wie oben bereits erwähnt, exprimieren stabil transfizierte Zellen dauerhaft nur moderate Level der überexprimierten Proteine. Dies kann dazu führen, dass in transient transfizierten Zellen Effekte auf einen Signalweg zu beobachten wären, die in stabil transfizierten Zellen dann jedoch nicht nachzuweisen sind.

Als dritte Ursache für die fehlende Aktivierung der für Rac1-beschriebenen Effektormoleküle kann man vermuten, dass Rac3 seine Effekte über weitere, bisher noch nicht entdeckte, Signalwege vermittelt.

Zusammenfassend zeigte sich eine deutliche Aktivierung des NF κ B-Signalwegs durch C1199-Tiam1 in PC3-Zellen. Diese ist möglicherweise mit der Herunterregulation von TIMP1 und TIMP2 assoziiert und erhöht so die Invasivität der PC3-Zellen. Die Aktivierung weiterer Signalmoleküle, die zuvor für den Tiam1/Rac1-Signalweg beschrieben wurden, ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisen.

6 Zusammenfassung

In den vorangehenden Publikationen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Expression von Tiam1 oder Rac3 im Prostatakarzinom mit einem signifikant erhöhten Rezidivrisiko und einem verkürzten progressionsfreien Überleben der Patienten assoziiert ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die funktionelle Relevanz einer Überexpression von Tiam1 und Rac3 im Prostatakarzinom *in vitro* zu untersuchen. Dazu wurde die humane Prostatakarzinomzelllinie PC3 stabil mit dem leeren pLZRS-Vektor bzw. den Wildtyp- oder konstitutiv-aktiven Formen von Tiam1 und Rac3 transfiziert.

Danach induzierte die Überexpression von Vollängen- und C1199-Tiam1 in PC3-Zellen jeweils einen „Pfannkuchen“-artigen Phänotyp und ein so genanntes *membrane ruffling*. In den funktionellen Untersuchungen wurde die Zell-Adhäsion an Laminin, die Zellmigration und die Matrigel-Invasion signifikant durch C1199-Tiam1 und V12-Rac3 stimuliert. Vollängen-Tiam1 und Wildtyp-Rac3 zeigten in den Analysen meist ähnliche aber weniger ausgeprägte Effekte als die konstitutiv-aktiven Formen. Die Zellproliferation wurde dabei weder durch die Wildtyp- noch durch die konstitutiv-aktiven Formen von Tiam1 oder Rac3 beeinflusst. Bei der Suche nach möglichen Ursachen für die erhöhte Invasivität fand sich eine Sekretionshemmung der invasionshemmenden Proteinaseinhibitoren TIMP1 und TIMP2 durch die konstitutiv aktiven Proteine, während die Sekretion der invasionsfördernden Gegenspieler MMP-2 und MMP-9 nicht beeinflusst wurde. Bei der Analyse der involvierten Signalwege wurde eine NFκB-Aktivierung durch C1199-Tiam1 gefunden. Für andere potenzielle Mediatoren des Tiam1/Rac-Signalwegs wie Cyklin D1, die MAP-Kinasen JNK, ERK1,2 und p38 sowie für Akt und die p70S6-Kinase ließen sich keine eindeutigen Effekte nachweisen.

Insgesamt zeigte sich, dass der Tiam1/Rac3-Signalweg über eine Steigerung von Zell-Substratadhäsion, Migration und Invasion zu einem aggressiveren Phänotyp in den PC3-Zellen führt. Die Invasionssteigerung wird dabei offenbar durch die Herabregulation von TIMP1 und TIMP2 vermittelt. Dies geschieht möglicherweise über einen NFκB-assoziierten Signalweg. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von Tiam1 oder Rac3 im Prostatakarzinom *in vivo* mit einem aggressiveren klinischen Verlauf und einem schlechteren Outcome der Patienten assoziiert ist, legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle des Tiam1/Rac3-Signalwegs bei der Progression des Prostatakarzinoms nahe.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmed N.N., Franke T.F., Bellacosa A., Datta K., Gonzalez-Portal M.E., Taguchi T., Testa J.R., Tschlis P.N. 1993.** The proteins encoded by c-akt and v-akt differ in post-translational modification, subcellular localization and oncogenic potential. *Oncogene*. 1993, Jul;8(7):1957-63.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J. 2002.** *Molecular Biology of the Cell. 4th ed.* New York : Garland Science, 2002.
- Andela V.B., Gordon A.H., Zotalis G., Rosier R.N., Goater J.J., Lewis G.D., Schwarz E.M., Puzas J.E., O'Keefe R.J. 2003.** NFkappaB: a pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone. *Clin Orthop Relat Res*. 2003, Oct;(415 Suppl):S75-85.
- Andela V.B., Schwarz E.M., Puzas J.E., O'Keefe R.J., Rosier R.N. 2000.** Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB. *Cancer Res*. 2000, Dec 1;60(23):6557-62.
- Belka C., Ganswindt U. 2006.** Recurrence of prostate cancer--value of salvage radiotherapy. *Urologe*. 2006, Oct;45(10):1266-70.
- Bellayr I.H., Mu X., Li Y. 2009.** Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments. *Future Med Chem.* . 2009, Sep;1(6):1095-1111.
- Berven L.A., Crouch M.F. 2000.** Cellular function of p70S6K: a role in regulating cell motility. *Immunol Cell Biol*. 2000, Aug;78(4):447-51.
- Böcker, Denk, Heitz. 2004.** Pathologie. *Urban & Fischer Verlag*. 2004, S. 895-898.
- Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification if microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72, 248-254.
- Buchsbaum R.J., Connolly B.A., Feig L.A. 2002.** Interaction of Rac exchange factor Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol*. 2002, Jun;22(12):4073-85.
- . **2003.** Regulation of p70S6 kinase by complex formation between the Rac guanine nucleotide exchange factor (Rac-GEF) Tiam1 and the scaffold spinophilin. *J Biol Chem*. 2003, May 23;278(21):18833-41.
- Cammarano M.S., Minden A. 2001.** Dbl and the Rho GTPases activate NF kappa B by I kappa B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent pathways. *J Biol Chem*. 2001, Jul 13;276(28):25876-82.

- Cantley L.C. 2002.** The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*. 2002, May 31;296(5573):1655-7.
- Chan A.Y., Coniglio S.J., Chuang Y.Y., Michaelson D., Knaus U.G., Philips M.R., Symons M. 2005.** Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene*. 2005, Nov 24;24(53):7821-9.
- Cheng L., Montironi R., Bostwick D.G., Lopez-Beltran A., Berney D.M. 2012.** Staging of prostate cancer. *Histopathology*. 2012, Jan;60(1):87-117.
- Corbetta S., Gualdoni S., Ciceri G., Monari M., Zuccaro E., Tybulewicz V.L., de Curtis I. 2009.** Essential role of Rac1 and Rac3 GTPases in neuronal development. *FASEB J*. 2009, May;23(5):1347-57.
- Davies G., Jiang W.G., Mason M.D. 2000.** Cell-cell adhesion molecules and signaling intermediates and their role in the invasive potential of prostate cancer cells. *J Urol*. 2000, Mar;163(3):985-92.
- DGU. 2009.** Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Oktober 2009.
- Ehler E., van Leeuwen F., Collard J.G., Salinas P.C. 1997.** Expression of Tiam-1 in the developing brain suggests a role for the Tiam-1-Rac signaling pathway in cell migration and neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*. 1997, Jan;9(1):1-12.
- Ellenbroek S.I., Collard J.G. 2007.** Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2007, 24(8):657-72.
- Engers R., Gabbert H.E. 2000.** Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000, Dec;126(12):682-92.
- Engers R., Mueller M., Walter A., Collard J.G., Willers R., Gabbert H.E. 2006 a.** Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinomas. *British Journal of Cancer*. 2006 a, 95:1081-1086.
- 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 b.** Rac upregulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression by redox-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase signaling. *FEBS J*. 2006 b, Oct;273(20):4754-69.
- Engers R., Springer E., Michiels F., Collard J.G., Gabbert H.E. 2001.** Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulation tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J Biol Chem*. 2001, Nov 9;276(45):41889-97.

- Engers R., Ziegler S., Mueller M., Walter A., Willers R., Gabbert H.E. 2007.** Prognostic relevance of increased Rac GTPase expression in prostate carcinomas. *Endocrine-Related Cancer*. 2007, 14:245-256.
- Engers. R., Gerharz. C.D., Donner. A., Mrzyk S, Krause-Paulus R., Petek O., Gabbert H.E. 1999.** In vitro invasiveness of human epithelioid-sarcoma cell lines: association with cell motility and inverse correlation with the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases. *Int J Cancer*. 1999, 80: 406-412.
- Epstein J.I., Allsbrook W.C. Jr, Amin M.B., Egevad L.L. und ISUP Grading, Committee. 2005.** The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005, Sep;29(9):1228-42.
- Etienne-Manneville S., Hall A. 2002.** Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002, Dec 12;420(6916):629-35.
- Freeman J.L., Abo A., Lambeth J.D. 1996.** Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J Biol Chem*. 1996, Aug 16;271(33):19794-801.
- Fu M., Wang C., Li Z., Sakamaki T., Pestell R.G. 2004.** Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004, Dec;145(12):5439-47.
- Gann P.H. 2002.** Risk factors for prostate cancer. *Rev Urol*. 2002, S. 4 Suppl 5: 3-10.
- . **2002.** Risk Factors for Prostate Cancer. *Rev Urol*. 2002, 4(Suppl 5): S3–S10.
- Gest C., Joimel U., Huang L., Pritchard L.L., Petit A., Dulong C., Buquet C., Hu C.Q., Mirshahi P., Laurent M., Fauvel-Lafève F., Cazin L., Vannier J.P., Lu H., Soria J., Li H., Varin R., Soria C. 2013.** Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2013, Feb 6;13:63.
- Giancotti F.G., Ruoslahti E. 1999.** Integrin signaling. *Science*. 1999, Aug 13;285(5430):1028-32.
- Guarino M., Rubino B., Ballabio G. 2007.** The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. June 2007, Bd. 39(3), 305–318.
- Gupta S., Barrett T., Whitmarsh A. J., Cavanagh J., Sluss H.K., Dérijard B., Davis R.J. 1996.** Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J*. 1996, 15(11): 2760–2770. .
- Haataja L., Groffen J., Heisterkamp N. 1997.** Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem*. 1997, Aug 15; 272(33):20384-8.

- Habets G.G., Scholtes E.H., Zuydgeest D., van der Kammen R.A., Stam J.C., Berns A., Collard J.G. 1994.** Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell*. 1994, 77, 537-549.
- Habets G.G., van der Kammen R.A., Stam J.C., Michiels F., Collard J.G. 1995 .** Sequence of the human invasion-inducing TIAM1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin. *Oncogene* . 1995 , Apr 6;10(7):1371-6.
- Hajdo-Milasinovic A., Ellenbroek S.I., van Es S., van der Vaart B., Collard J.G. 2007.** Rac1 and Rac3 have opposing functions in cell adhesion and differentiation of neuronal cells. *J Cell Sci*. 2007, Feb 15;120(Pt 4):555-66.
- Hall A. 1998.** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998, Jan 23;279(5350):509-14.
- Hautmann, Huland. 2006.** *Urologie*. 3.Auflage : Springer Verlag, 2006. S. 229-241.
- Hayes R.B., Pottern L.M., Strickler H., Rabkin C., Pope V., Swanson G.M., Greenberg R.S., Schoenberg J.B., Liff J., Schwartz A.G., Hoover R.N., Fraumeni J.F. 2000.** Sexual behavior, STDs and risks for prostate cancer. *Br J Cancer*. 2000, Feb;82(3):718-25.
- Hoffman G.R., Cerione R.A. 2002.** Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS Lett*. 2002, 513: 85-91.
- Hordijk P.L., ten Klooster J.P., van der Kammen R.A., Michiels F., Oomen L.C., Collard J.G. 1997.** Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science*. 1997, Nov 21;278(5342):1464-6.
- Hsing A.W., Tsao L., Devesa S.S. 2000.** International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*. 2000, Jan 1; 85 (1): 60-67.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. 2011.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011, Mar-Apr;61(2):69-90.
- Johnson G.L., Lapadat R. 2002.** Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002, Dec 6;298(5600):1911-2.
- 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*. 1997, Dec 11;390(6660):632-6.
- Keller P.J., Gable C.M., Wing M.R., Cox A.D. 2005.** Rac3-mediated transformation requires multiple effector pathways. *Cancer Res*. 2005, Nov 1;65(21):9883-90.

- Klein E.A., Yang C., Kazanietz M.G., Assoian R.K. 2007.** NF κ B-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. *Cell Cycle*. 2007, May 2;6(9):1115-21.
- Kleinman H.K., McGarvey M.L., Hassell J.R., Star V.L., Cannon F.B., Laurie G.W., Martin G.R. 1986.** Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*. 1986, Jan 28;25(2):312-8.
- Krishna M., Narang H. 2008.** The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci*. 2008, Nov;65(22):3525-44.
- Leeuwen F.N., Kain H.E., Kammen R.A., Michiels F., Kranenburg O.W., Collard J.G. 1997.** The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol*. 1997, Nov 3;139(3):797-807.
- Lenassi M., Plemenitaš A. 2006.** The role of p38 MAP kinase in cancer cell apoptosis. *Radiol Oncol*. 2006, 40(1): 51-6.
- Liotta L.A., Kleinerman J., Saidel G.M. 1974 .** Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*. . 1974 , May;34(5):997-1004.
- Löffler G., Petrides P. 2003 b.** Biochemie und Pathobiochemie 7. Auflage. s.l. : Springer-Verlag, 2003 b, S. 799.
- **2003 c.** Biochemie und Pathobiochemie 7. Auflage. s.l. : Springer-Verlag, 2003 c, S. 291.
- **2003 d.** Biochemie und Pathobiochemie, 7. Auflage. s.l. : Springer-Verlag, 2003 d, S. 262.
- Mareel M., Boterberg T., Noe V., Van Hoorde L., Vermeulen S., Bruyneel E., Bracke M. 1997.** E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion. *J Cell Physiol*. 1997, Nov;173(2):271-4.
- Mehlen P., Puisieux A. 2006.** Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*. 2006, Jun 6(6):449-58.
- Mertens A.E., Roovers R.C., Collard J.G. 2003.** Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Lett*. 2003, Jul 3;546(1):11-6.
- Michiels F., Habets G.G., Stam J.C., van der Kammen R.A., Collard J.G. 1995.** A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature*. 1995, May 25;375(6529):338-40.
- Michiels F., Stam J.C., Hordijk P.L., van der Kammen R.A., Ruuls-Van Stalle L., Feltkamp C.A., Collard J.F. 1997.** Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH₂-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH₂-terminal kinase activation. *J Cell Biol*. 1997, Apr 21;137(2):387-98.

- Minard M.E., Ellis L.M., Gallick G.E. 2006.** Tiam1 regulates cell adhesion, migration and apoptosis in colon tumor cells. *Clin Exp Metastasis*. 2006, 23(5-6):301-13.
- Minard M.E., Kim L.S., Price J.E., Gallick G.E. 2004.** The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression. *Breast Cancer Res Treat*. 2004, Mar;84(1):21-32.
- Minden A., Lin A., Claret F.X., Abo A., Karin M. 1995.** Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*. 1995, Jun 30;81(7):1147-57.
- Mira J.P., Benard V., Groffen J., Sanders L.C., Knaus U.G. 2000.** Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, Jan 4;97(1):185-9.
- Perona R., Montaner S., Saniger L., Sánchez-Pérez I., Bravo R., Lacal J.C. 1997.** Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev*. 1997, Feb 15;11(4):463-75.
- Ramsay A.K., Leung H.Y. 2009.** Signalling pathways in prostate carcinogenesis: potentials for molecular-targeted therapy. *Clin Sci (Lond)*. 2009, Aug 14;117(6):209-28.
- Ray J.M., Stetler-Stevenson W.G. 1994.** The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J*. 1994, Nov;7(11):2062-72.
- Ridley A. J., Paterson C. L., Johnston C. L., Diekmann D., Hall A. 1992 b.** The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992 b, 70, 401-410 .
- Ridley A.J., Hall A. 1992 a.** The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992 a, Aug 7; 70(3):389-99.
- Ridley, A.J. 2001.** Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*. 2001, Aug;114(Pt 15):2713-22.
- Robbe K., Otto-Bruc A., Chardin P., Antony B. 2003.** Dissociation of GDP dissociation inhibitor and membrane translocation are required for efficient activation of Rac by the Dbl homology-pleckstrin homology region of Tiam. *J Biol Chem*. 2003, Feb 14;278(7):475.
- 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*. 2008, Apr 15;121(Pt 8):1183-92.

- Sánchez-Chapado M., Olmedilla G., Cabeza M., Donat E., Ruiz A. 2003.** Prevalence of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia in Caucasian Mediterranean males: an autopsy study. *Prostate*. 2003, Feb 15;54(3):238-47.
- Sander E.E., van Delft S., ten Klooster J.P., Reid T., van der Kammen R.A., Michiels F., Collard J.G. 1998.** Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol*. 1998, Nov 30;143(5):1385-98.
- Sardana G., Dowell B., Diamandis E.P. 2008.** Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Clin Chem*. . 2008, Dec;54(12):1951-60.
- Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. 2001.** Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 2001, 11(4):173-86.
- Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R. 1988.** Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988, Sep 1;48(17):4827-33.
- Shi Y.L., Miao R.Z., Cheng L., Guo X.B., Yang B., Jing C.Q., Zhang L., Jin X., Li L.P. 2013.** Up-regulation of T-lymphoma and metastasis gene 1 in gastric cancer and its involvement in cell invasion and migration. *Chin Med J*. 2013, Feb;126(4):640-5.
- Shimizu H., Ross R.K., Bernstein L., Yatani R., Henderson B.E., Mack T.M. 1991.** Cancer of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer*. 1991, Jun;63(6):963-6 .
- Sökelland J., Weiß H.E. 2007.** www.prostata.de. [Online] 2007. http://www.prostata.de/pca_wachstum.html.
- Sroka I.C., Anderson T.A., McDaniel K.M., Nagle R.B., Gretzer M.B., Cress A.E. 2010.** The laminin binding integrin alpha6beta1 in prostate cancer perineural invasion. *J Cell Physiol*. 2010, Aug;224(2):283-8.
- Sulciner D.J., Irani K., Yu Z.X., Ferrans V.J., Goldschmidt-Clermont P., Finkel T. 1996.** Rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*. 1996, Dec;16(12):7115-21.
- Sun M., Wang G., Paciga J.E., Feldman R.I., Yuan Z.Q., Ma X.L., Shelley S.A., Jove R., Tsihchlis P.N., Nicosia S.V., Cheng J.Q. 2001.** AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T cells. *Am J Pathol*. 2001, Aug;159(2):431-7.

- ten Klooster J.P., Hordijk P.L. 2007.** Targeting and localized signalling by small GTPases. *Biol Cell.* 2007, Jan;99(1):1-12.
- Umbas R., Schalken J.A., Aalders T.W., Carter B.S., Karthaus H.F., Schaafsma H.E., Debruyne F.M., Isaacs W.B. 1992.** Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res.* 1992, Sep 15;52(18):5104-9.
- Vanni C., Mancini P., Gao Y., Ottaviano C., Guo F., Salani B., Torrissi M.R., Zheng Y., Eva A. 2002.** Regulation of proto-Dbl by intracellular membrane targeting and protein stability. *J Biol Chem.* . 2002, May 31;277(22):19745-53.
- Visse R., Nagase H. 2003.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003, May 2;92(8):827-39.
- Weinberg R.A. 1984.** ras Oncogenes and the molecular mechanisms of carcinogenesis. *Blood.* 1984, (64):1143-1145.
- Wennerberg K., Der C.J. 2004.** Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci.* 2004, Mar 15;117(Pt 8):1301-12.
- Woodhouse E.C., Chuaqui R.F., Liotta L.A. 1997 .** General mechanisms of metastasis. *Cancer.* 1997 , Oct 15;80(8 Suppl):1529-37.
- Yap A.S., Briher W.M., Gumbiner B.M. 1997.** Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997, 13, 119-146.
- Yurchenco P.D., Cheng Y.S., Colognato H. 1992.** Laminin forms an independent network in basement membranes. *J Cell Biol.* 1992, 117: 1119-1133.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Karlsruhe, den 16.06.2013 Friederike Damm

Unterschrift