

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

Funktionelle Relevanz des Tiam1/Rac3- Signalwegs für die Entstehung des Prostatakarzinoms

Dissertation

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

vorgelegt von
Anne Fiederling
2016

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

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

Dekan

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Engers

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. Ahmadian

Für meine Eltern
In Gedenken an meine Großeltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht (Tagungsbeiträge):

Maaßen, A., Ziegler, S., Collard, J.G., Gabbert, H.E., Engers, R. (2007) Funktionelle Bedeutung der Rho-ähnlichen GTPase Rac3 für die Entstehung des Prostatakarzinoms **(Vortrag)**. 5. DPKK-Mitgliederversammlung und 5. DPKK-Workshop, Nonnweiler/Saarland

Maaßen, A., Ziegler, S., Collard, J.G., Gabbert, H.E., Engers, R. (2008) Role of the Rho-like GTPase Rac3 in prostate cancer development **(Postervortrag)**. 28. Deutscher Krebskongress, Berlin

Maaßen, A., Ziegler, S., Collard, J.G., Gabbert, H.E., Engers, R. (2008) Funktionelle Bedeutung der Rho-ähnlichen GTPase Rac3 für die Entstehung des Prostatakarzinoms **(Poster, Postervortrag, 3. Posterpreis)**. *Der Pathologe, Supplement 1 und 2, 2008, 2. Woche der Pathologie - 92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V. gemeinsam mit dem Berufsverband Deutscher Pathologen e. V. und der Internationalen Akademie für Pathologie, Deutsche Abteilung e. V., Berlin*

Hoffmann, M.J., Maaßen, A., Ziegler, S., Collard, J.G., Ekici, A.B., Gabbert, H.E., Engers, R. (2010) The implications of Tiam1/Rac3 signaling in prostate carcinogenesis **(Vortrag)**. 2. Symposium Urologische Forschung der deutschen Gesellschaft für Urologie, Mainz

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1	Molekulare Kanzerogenese und Tumorcharakteristika	1
1.1	Tumorentstehung	1
1.2	Invasion und Metastasierung	6
1.2.1	Molekulare Mechanismen der Tumorinvasion	7
1.2.1.1	Tumorzelldissoziation	7
1.2.1.2	Substratadhäsion	8
1.2.1.3	Proteolyse	8
1.2.1.4	Migration	9
2	Das Prostatakarzinom	10
2.1	Epidemiologie	10
2.2	Risikofaktoren	11
2.3	Klinik und Diagnostik	11
2.4	TNM-Klassifikation und Grading	12
2.5	Therapie	13
2.6	Prostatische intraepitheliale Neoplasie (PIN)	14
2.7	Molekulare Grundlagen	15
2.7.1	Bedeutung hereditärer Prostatakarzinome	15
2.7.2	Wichtige molekulare Veränderungen	16
2.8	Rac3 und Tiam1 als prognostisch relevante Marker	18
3	Der Tiam1/Rac-Signalweg	19
3.1	Die Rho-ähnliche GTPase Rac	19
3.2	Tiam1 als Rac-spezifischer Aktivator	21
3.2.1	Struktur von Tiam1	22
3.2.2	Regulation von Tiam1	23
3.3	Funktionelle Relevanz des Tiam1/Rac-Signalwegs	24
4	Zielsetzung der Arbeit	29
II.	MATERIAL	30
1	Biologisches Material	30
1.1	Zelllinie	30
1.2	Bakterienstamm	30
2	Medien, Puffer und Lösungen	30
3	DNA- und Protein-Standards	32
4	Enzyme	32
5	Molekularbiologische KIT-Systeme	33

6	Oligodesoxynukleotide	33
6.1	PCR-Primer für Klonierungen	33
6.2	Sequenzierprimer	33
7	Vektoren	33
8	Plasmidkonstrukte und Umklonierungen	34
9	Transfizierte BPH-1-Zelllinien	34
10	Primärantikörper	35
11	Sekundärantikörper	35
12	Verbrauchsmaterialien	35
13	Reagenzien	36
14	Laborgeräte	38
III.	METHODEN	39
1	Molekularbiologische Methoden	39
1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
1.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	39
1.3	DNA-Gelelektrophorese	40
1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
1.5	Klonierung	41
1.5.1	Restriktionshydrolyse	41
1.5.2	Herstellung von glatten DNA-Enden	42
1.5.3	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	42
1.5.4	Gelelution	42
1.5.5	Ligation	43
1.5.6	Transformation	43
1.5.7	Kolonie-PCR	43
1.5.8	Herstellung von Glycerinkulturen	44
1.6	Sequenzierung	44
2	Zellbiologische Methoden	45
2.1	Kultivierung der benignen Prostataepithelzellen BPH-1	45
2.1.1	Subkultivierung	45
2.1.2	Zellzählung	45
2.1.3	Kryokonservierung	46
2.1.4	Auftauen von Zellen	46
2.2	Stabile Transfektion	46
2.2.1	X-Gal-Färbung zur Optimierung der Transfektionseffizienz	46
2.2.2	Stabile Transfektion mit FuGENE 6	47
2.3	Herstellung totaler Zelllysate	48
2.4	Immunocytochemie	49

3	Biochemische Methoden	49
3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	49
3.2	Probenvorbereitung	50
3.3	SDS-Gelelektrophorese	50
3.4	Western Blot	51
3.5	Immunologische Proteindetektion mithilfe der Chemilumineszenz	51
3.6	Proteindetektion mithilfe des Odyssey Infrared Imaging Systems	52
3.7	Entfernen von Antikörpern von einer Membran	53
3.8	Rac-Aktivitätsassay	53
4	Funktionelle Untersuchungen	54
4.1	Proliferationsassays	54
4.1.1	XTT-Proliferationsassay	54
4.1.2	Wachstumskurven nach Zellzählung	55
4.2	Adhäsionsassays	55
4.2.1	Beurteilung der Zell-Zelladhäsion und der Zellmorphologie	55
4.2.2	Bestimmung der Zell-Substratadhäsion	55
4.3	Migrationsassays	56
4.3.1	Transwell-Migrationsassay	56
4.3.2	Scratch assay	57
4.4	Matrigel-Invasionsassay	57
4.5	Transformationsassays	58
4.5.1	Soft agar assay	58
4.5.2	Colony formation assay	59
IV.	ERGEBNISSE	60
1	Umklonierung und stabile Transfektion von BPH-1-Zellen	60
2	Zellbiologische Effekte von Rac3 und Tiam1	65
2.1	Proliferationsaktivität	65
2.2	Zell-Zelladhäsion und Zellmorphologie	69
2.3	Effekte auf die subzelluläre Verteilung des Aktinzytoskeletts	72
2.4	Zell-Substratadhäsion an Laminin	74
2.5	Zellmigration	75
2.6	Invasionsverhalten	79
2.7	Onkogene Transformation	80
V.	DISKUSSION	84
1	Modellsystem	85
2	Effekte von Rac3 und Tiam1 in funktionellen Untersuchungen	87
2.1	Effekte auf die Proliferation	87

2.2	Effekte auf die Zell-Zelladhäsion und den Phänotyp	89
2.3	Effekte auf die Zell-Substratadhäsion an Laminin	93
2.4	Effekte auf die Migration	94
2.5	Effekte auf die Invasion	96
2.6	Effekte auf die onkogene Transformation	97
3	Schlussfolgerungen mit Ausblick	100
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	102
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	103
VIII.	DANKSAGUNG	116
IX.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	117

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	ml/100 ml
% (w/v)	g/100 ml
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammonium-Persulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsd	Blasticidin
CC	<i>Coiled-Coil-Region</i> , eine Domäne von Tiam1
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C-terminal	Carboxyterminal
Dbl	<i>Diffuse B-cell lymphoma</i>
DH	<i>Dbl homology</i>
DHR	<i>Discs large homology region</i> , eine Domäne von Tiam1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
d-/dNTP	Di-/Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular Related Kinase</i>
Ex	<i>Extended-Domäne</i> , eine Domäne von Tiam1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: <i>Fetal Calf Serum</i>)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FL-Tiam1	Volllängen-Tiam1 (engl.: <i>full length</i>)
g	Erdbeschleunigung (engl.: <i>Gravity</i>)
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Gunaninnukleotid-Austauschfaktor (engl.: <i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
HG-PIN	<i>High-grade</i> prostatistische intraepitheliale Neoplasie
IgG	Immunglobulin G

JIP/IB2	JIP/islet brain
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	kilo-Dalton (Molekularmasse)
LB	Luria Bertani
LOH	Heterozygotieverlust (engl.: <i>loss of heterozygosity</i>)
mA	Milliampère
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase (engl.: <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MLK2 oder 3	<i>Mixed-lineage-kinase</i> 2 oder 3
MMP	Matrix-Metalloproteinase
N-terminal	Aminoterminal
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	p21-aktivierte Proteinkinase (engl.: <i>p21-activated kinase</i>)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDZ	„PSD-95/DlgA/ZO-1“-Domäne, eine Domäne von Tiam1
PEST	Prolin (P)-, Glutamat (E)-, Serin (S)-, Threonin (T)-reicher Proteinabschnitt, zwei Domänen von Tiam1
PH	<i>Pleckstrin homology</i> , eine Domäne von Tiam1
PHc / PHn	C-terminal bzw. N-terminal lokalisierte PH-Domäne von Tiam1
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
Rac	<i>RAS-related C3 botulinum substrate</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RBD	Ras-bindende Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rotations per minute</i>)
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
s	Sekunde
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TEMED	N, N, N, 'N'-Tetramethylethyldiamin
Tiam1	<i>T-Lymphoma invasion and metastasis 1</i>
C1199-Tiam1	Deletionsmutante von Tiam1, die aus den C-terminalen 1199 Aminosäuren besteht
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamine-Isothiocyanat
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
V	Volt
V12-Rac3	konstitutiv aktives Rac3
W	Watt
wt-Rac3	Wildtyp-Rac3
Zeo	Zeocin
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

1 Molekulare Kanzerogenese und Tumorcharakteristika

Bösartige Tumorerkrankungen, welche im allgemeinen Sprachgebrauch als Krebs bezeichnet werden, stellen in den westlichen Industrieländern nach den Krankheiten des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache dar (Statistisches-Bundesamt, 2010). Krebs wird dabei als Sammelbegriff für viele verwandte Krankheiten verwendet. Es handelt sich um eine genetische Erkrankung, die zu einer starken Vermehrung körpereigener entarteter (transformierter) Zellen führt (Hanahan und Weinberg, 2000).

Wachstum (Proliferation), Differenzierung und Apoptose (programmierter Zelltod) jeder einzelnen Zelle sind normalerweise genau geregelt. Die Zelle registriert durch Rezeptoren verschiedenste Signale und verarbeitet diese in unterschiedlichen fein aufeinander abgestimmten Signalwegen. Eine unkontrollierte Zellproliferation kann durch eine Fehlregulation des Gleichgewichts zwischen wachstumshemmenden und wachstumsstimulierenden Signalen hervorgerufen sein. Daher sind für die Entstehung maligner (bösartiger) Tumoren auf molekularer Ebene insbesondere Regulationsstörungen in Genen verantwortlich, die den Zellzyklus kontrollieren (Böcker et al., 2008; Hanahan und Weinberg, 2000)

1.1 Tumorentstehung

Die meisten malignen Tumoren werden durch eine Akkumulation mehrerer somatischer Mutationen verursacht (*Multi-Hit-Konzept*) (Vogelstein und Kinzler, 1993). Es handelt sich um einen mehrstufigen Prozess, bei dem die einzelnen Stufen genetische Veränderungen darstellen, die normale menschliche Zellen durch zunehmende Transformation zu höchst malignen Tumorzellen machen (Hanahan und Weinberg, 2000). Dabei sind eine Reihe genetischer und epigenetischer Veränderungen entscheidend, die auf verschiedene Art und Weise alle zu einem gewissen Wachstumsvorteil führen. Dieser Prozess der Tumorentstehung dauert häufig mehrere Jahre (Barrett, 1993). Dabei scheinen vier bis sieben voneinander unabhängige genetische Ereignisse an der Entwicklung eines malignen Tumors beteiligt zu sein (Hanahan und Weinberg, 2000; Renan, 1993). Die monoklonale Entwicklungstheorie geht davon aus, dass die Tumorentstehung durch Transformation einer einzigen Zelle zu einer Tumorstammzelle eingeleitet wird (Böcker et al., 2008). Die Karzinogenese ist bislang in epithelialen Geweben am besten erforscht und wird häufig in verschiedene Stadien unterteilt (Mehrschritt-Theorie). Unterschieden werden die Initiation, die

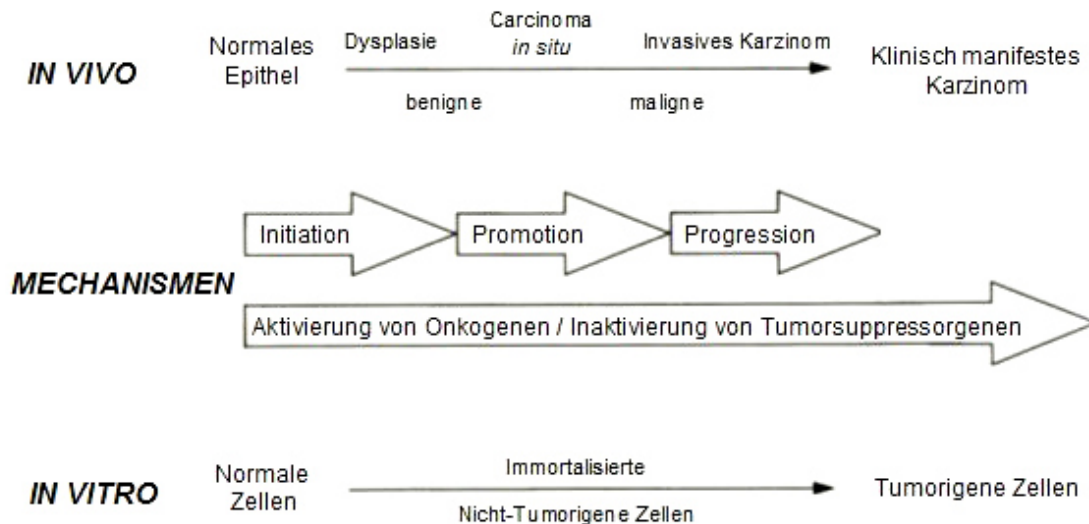


Abb. I.1 Schematische Darstellung der Mehrschritt-Theorie der Krebsentstehung in menschlichen epithelialen Geweben und Zellen.

Darstellung eines Konzepts der schrittweisen Induktion von genotypischen und phänotypischen Veränderungen in der Karzinogenese, welches sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht werden kann. Für Details siehe Text. Die Abbildung wurde modifiziert nach Grafström et al. (1997).

Promotion und die Progression (Abb. I.1) (Barrett, 1993; Grafström et al., 1997). *In vivo* wird während der Initiation eine einzelne Zelle durch eine Mutation der DNA irreversibel verändert (Barrett, 1993). Dadurch erhält diese beispielsweise eine veränderte Ansprechbarkeit auf Regulatoren des Zellwachstums, der Differenzierung oder des Zelltods (Grafström et al., 1997). Während der anschließenden Phase der Promotion entwickelt sich durch klonale Expansion und Selektion eine gutartige Läsion oder eine Zellpopulation präneoplastischer Zellen (Barrett, 1993; Grafström et al., 1997). Hierfür sind epigenetische und möglicherweise auch genetische Veränderungen verantwortlich (Barrett, 1993). Erst zusätzliche irreversible genetische Veränderungen führen im Rahmen der Tumorprogression zur Transformation mit Entstehung eines malignen Phänotyps. Die Progression zeichnet sich hauptsächlich durch ein unkontrolliertes Wachstum mit der Erlangung von Eigenschaften zur Invasion und Metastasenbildung aus (Barrett, 1993; Vogelstein und Kinzler, 1993).

Die Größenzunahme ist vor allem durch klonale Zellproliferation, durch eine größere Zellproduktionsrate im Vergleich zur Zellverlustrate und durch Tumorangiogenese möglich (Abb. I.2). Durch eine starke Proliferation alleine können lediglich mikroskopisch große Tumoren von rund 1 mm³ oder weniger entstehen, da die Ernährung durch Diffusion aus der Umgebung nicht mehr ausreicht (Folkman, 2006; Hanahan und Folkman, 1996). Durch Freisetzung bestimmter Faktoren ist der Tumor selbst in der Lage, die Bildung des

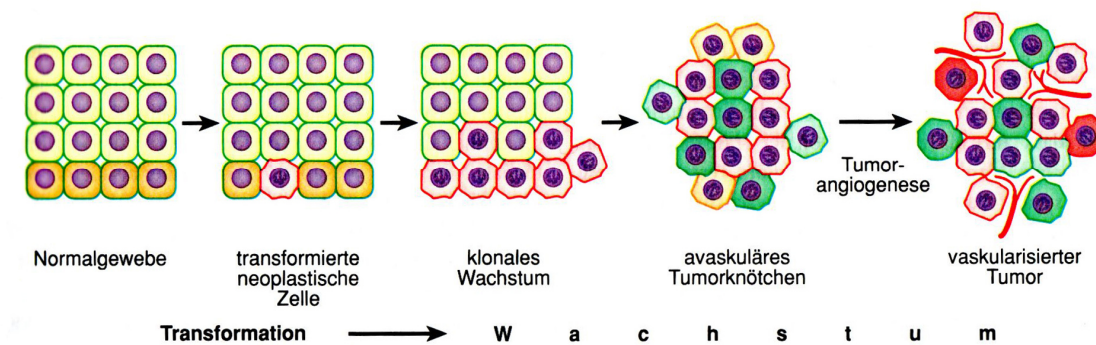


Abb. I.2 Modell der Entwicklung eines Tumors.

Nach Entstehung einer transformierten neoplastischen Zelle (Tumorstammzelle, rot) kommt es zunächst zu klonalem Wachstum. Mit zunehmendem Wachstum entsteht ein avaskuläres Tumorknötchen, welches eine erhebliche Zellheterogenität (rot, gelb, grün) aufweisen kann. Dabei zeigen einige dieser Tumorstammzellen eine Differenzierung ähnlich dem Muttergewebe (gelb). Ab einer Größe von ca. 1 mm³ entwickelt sich durch Angiogenese ein vaskularisierter Tumor. Aus Böcker, Pathologie, 4. Auflage 2008 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.

gefäßführenden Gewebes zu induzieren. Damit ist die Angiogenese neben der Tumorzellproliferation für die Entstehung eines malignen Tumors unbedingt erforderlich (Folkman, 2006).

In der Regel liegt auch eine erhebliche Tumorzellheterogenität aufgrund einer genomischen Instabilität vor (Abb. I.2) (Cahill et al., 1999; Negrini et al., 2010). Diese kann z. B. durch eine molekulare Veränderung ausgelöst werden, die zunächst eine unkontrollierte oder fehlerhafte DNA-Synthese verursacht und dadurch letztendlich eine Akkumulation zusätzlicher DNA-Mutationen erleichtert (Coleman und Tsongalis, 1995; Peltomaki, 2011). Die schrittweise Umwandlung normaler Zellen in Tumorzellen entsteht also durch eine Anhäufung genetischer Veränderungen, die jeweils einen gewissen Wachstumsvorteil mit sich bringen (Hanahan und Weinberg, 2000). Als Folge können sich innerhalb des Tumors verschiedene Subklone bilden, die unterschiedliche zellbiologische Fähigkeiten entwickeln (Böcker et al., 2008; Vogelstein und Kinzler, 1993). Dazu gehören beispielsweise Eigenschaften, die das Wachstum, die Differenzierung oder die Invasion und Metastasierung betreffen (Vogelstein und Kinzler, 1993). Damit verläuft der Prozess der Karzinogenese vom Prinzip her analog der Darwinschen Evolution (Cahill et al., 1999; Hanahan und Weinberg, 2000).

Zusammengefasst gibt es in der aktuellen Tumorforschung sechs essenzielle Veränderungen in der Zellphysiologie, die malignes Wachstum definieren (Hanahan und Weinberg, 2000): hierzu gehören die Autonomie gegenüber Wachstumssignalen, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Einflüssen, die Umgehung der Apoptose, eine uneingeschränkte Vermehrungsfähigkeit mit ununterbrochener Angiogenese sowie die Fähigkeit zur

Gewebsinvasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Negrini et al. (2010) schlugen zudem die genomische Instabilität als weiteres Kennzeichen von malignen Tumoren vor.

Die Induktion genotypischer und phänotypischer Veränderungen in der Karzinogenese lässt sich nicht nur *in vivo*, sondern auch *in vitro* untersuchen (Abb. I.1). Beispielsweise wird die immortalisierte (unsterblich gemachte), nicht-tumorigene menschliche Prostataepithelzelllinie BPH-1 als ein geeignetes Modell für die *in-vitro*-Untersuchung der Entstehung des Prostatakarzinoms angesehen (Hayward et al., 1995). Durch Immortalisierung wird die begrenzte Anzahl von Zellteilungen aufgehoben, so dass sich Zellen unbegrenzt vermehren können (Dimri et al., 2005; Heeg et al., 2006). Zwar stellt die Immortalisierung als initiales Stadium der *in-vitro*-Karzinogenese ein Schlüsselereignis bzw. eine Voraussetzung in der malignen Transformation dar, allerdings reicht sie alleine nicht für eine Transformation aus. Immortalisierte, nicht-tumorigene Zellen sind damit benigne Zellen, die einen Übergang zwischen normalen Zellen und Tumorzellen darstellen (Grafström et al., 1997; Heeg et al., 2006). Bei der malignen Transformation handelt es sich stattdessen um einen komplexen Prozess, der neben der Immortalisierung zusätzliche genetische Veränderungen benötigt (Rao et al., 2006). *In vitro* können diese genetischen Veränderungen als Konsequenz eines einzelnen Ereignisses entstehen, wie z. B. durch die Mutation eines Onkogens oder eines Tumorsuppressorgens (Sherman et al., 1999). Dies muss dann nicht unbedingt bedeuten, dass diese für die *in-vitro*-Karzinogenese relevante Mutation auch *in vivo* alleine zu einer malignen Transformation von Zellen führt. Allerdings kann das Ergebnis der *in-vitro*-Untersuchung als starker Hinweis darauf gewertet werden, dass diese genetische Veränderung auch *in vivo* eine entscheidende Bedeutung in der Karzinogenese besitzen könnte (Heeg et al., 2006).

Die Initiation der Karzinogenese und die Tumorprogression werden durch genetische Veränderungen hervorgerufen. Diese umfassen sowohl geringe Modifikationen der Sequenz (z. B. Insertionen, Deletionen, Punktmutationen) als auch chromosomale Aberrationen. Diese Veränderungen können den Verlust, eine strukturelle Modifikation, Überproduktion oder konstitutive Aktivierung eines Proteins bewirken. Hauptsächlich sind von diesen genetischen Veränderungen neben den DNA-Reparaturgenen zwei antagonistische Genklassen betroffen: die Protoonkogene und die Tumorsuppressorgene (Abb. I.1) (Bertram, 2000; Böcker et al., 2008; Coleman und Tsongalis, 1995; Mutch und DiSaia, 2007).

Protoonkogene sind physiologische zelluläre Gene, welche Proteine kodieren, die die Proliferation, Mobilität und Differenzierung von Zellen steuern. Durch Punktmutationen und andere genetische Veränderungen, wie chromosomale Translokationen oder Amplifikationen

(Vermehrung der Genkopienzahl), können Protoonkogene zu Onkogenen aktiviert werden. Diese aktivierten Formen sind in der Lage, die Zellvermehrung so stark zu stimulieren, dass betroffene Zellen maligne transformieren können und zur Entstehung und Progression von Tumoren führen (Bertram, 2000; Böcker et al., 2004; Coleman und Tsongalis, 1995; Kopnin, 2000; Mutch und DiSaia, 2007). Zugrunde liegende Mechanismen sind zum einen eine konstitutive Aktivierung von Onkoproteinen (Genprodukte mutierter Protoonkogene). Unter „konstitutiv aktiv“ wird dabei verstanden, dass qualitativ veränderte Proteine eine eigenständige biologische Aktivität entwickeln (Böcker et al., 2004). Somit ist zur Aktivierung beispielsweise eine Stimulation durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren nicht mehr notwendig. Zum anderen kann auch eine Überexpression - also eine stark vermehrte Bildung - strukturell nicht veränderter Proteine eine Überfunktion im betreffenden Signalweg bewirken (Bertram, 2000; Böcker et al., 2004; Kopnin, 2000). Mutationen in den Protoonkogenen führen dadurch zu einem Funktionsgewinn (*gain of function*). Sie weisen ein dominantes Verhalten auf, da eine Mutation in einem der beiden Allele für eine onkogene Transformation ausreicht (Bertram, 2000; Böcker et al., 2004). Mittlerweile sind annähernd 200 verschiedene Onkogene bekannt (Böcker et al., 2004). Sowohl Wachstumsfaktoren (z. B. PDGF), Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z. B. EGF-Rezeptor), Proteine der intrazellulären Signaltransduktion (z. B. Ras-Proteine) als auch nukleäre Transkriptionsfaktoren (z. B. c-myc, Cyclin D1) werden den Protoonkoproteinen zugeordnet (Böcker et al., 2008; Coleman und Tsongalis, 1995; Mutch und DiSaia, 2007). Insbesondere Ras-Proteine spielen bei der Entstehung vieler Tumoren eine wichtige Rolle. Dies sind GTP-bindende Proteine, welche als molekulare Schalter eine entscheidende Bedeutung in der Signaltransduktion haben. Fast 25 % aller malignen Tumoren weisen Ras-Mutationen auf (Buday und Downward, 2008; Hanahan und Weinberg, 2000).

Die Inaktivierung oder eine Funktionsstörung von Tumorsuppressorgenen haben für die Entstehung maligner Tumoren eine genauso große Bedeutung wie die Aktivierung von Protoonkogenen. Allerdings kodieren Tumorsuppressorgene Proteine, welche meist als Kontrollpunkte der Zellproliferation und des Zelltods dienen und damit eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum besitzen (Bertram, 2000; Coleman und Tsongalis, 1995; Kopnin, 2000). Die in der Karzinogenese beteiligten, veränderten Tumorsuppressorgene bewirken einen Funktionsverlust der kodierten Proteine (*loss of function*) und führen dadurch zu einem deregulierten Wachstum von Tumorzellen. Durch ein rezessives Verhalten führt erst die Inaktivierung beider Allele eines Tumorsuppressorgens zur tumorfördernden Wirkung (Böcker et al., 2004; Mutch und DiSaia, 2007; Peltomaki, 2011). Heutzutage sind mehr als 70 Tumorsuppressorgene mit unterschiedlichen Funktionen bekannt. Dazu gehören z. B. TP53, RB1, WT1, APC, BRCA1 und -2 sowie E-Cadherin (Böcker et al., 2008).

Darüber hinaus können häufig auch epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von malignen Tumoren spielen. Hierzu gehören beispielsweise Histon-Modifikationen oder die Änderung des Methylierungsmusters verschiedener Gene, wodurch die Genexpression beeinflusst wird (Peltomaki, 2011).

1.2 Invasion und Metastasierung

Für den klinischen Verlauf und die Prognose maligner Tumorerkrankungen ist die Fähigkeit von Tumorzellen zur Invasion und Metastasenbildung entscheidend (Engers und Gabbert, 1998; Liotta und Stetler-Stevenson, 1991; Mareel und Leroy, 2003). Der Prozess der Metastasierung lässt sich vereinfacht in mehrere, aufeinanderfolgende Schritte unterteilen und wird insgesamt als Metastasierungskaskade bezeichnet. Es handelt sich um einen sehr umfassenden, dynamischen Vorgang, welcher verschiedenste Interaktionen einerseits zwischen mehreren Tumorzellen und andererseits zwischen Tumorzellen und Bestandteilen des angrenzenden Wirtsgewebes einbezieht (Engers und Gabbert, 1998; 2000; Mareel und Leroy, 2003; Mareel et al., 1993).

Zu Beginn erfolgt die sogenannte Tumorzelldissoziation, bei der es zu einer Herauslösung maligner Zellen aus dem Primärtumor kommt. Es schließen sich die Tumordinvasion mit aktiver Infiltration des umgebenden Gewebes sowie die Intravasation, bei der die malignen Zellen in Lymph- oder Blutgefäße einbrechen, an. Über das Gefäßsystem werden diese Zellen in andere Körperbereiche verstreut. Durch aktives Verlassen der Gefäße erfolgt die Extravasation mit anschließender Sekundärinvasion des Gewebes (Engers und Gabbert, 1998; 2000; Liotta und Stetler-Stevenson, 1991; Mareel et al., 2009). Bei der Metastasierung handelt es sich um einen sehr ineffektiven Prozess, da die meisten Tumorzellen im Zielorgan absterben und nur ein sehr geringer Prozentsatz von $< 0,1\%$ in der Lage ist, die Metastasenbildung zu initiieren (Engers und Gabbert, 1998; Liotta und Stetler-Stevenson, 1991; van Zijl et al., 2011). Eine wichtige Rolle spielt außerdem der Zustand der sogenannten *Tumor Dormancy*. Hierdurch können auch Jahre bis Jahrzehnte später Metastasen entstehen, indem diese Zellen zunächst über mehrere Jahre im Zielorgan inaktiv bleiben, bevor sie unter gewissen Voraussetzungen erneut zu proliferieren beginnen (Engers und Gabbert, 1998; 2000; Mareel et al., 2009; van Zijl et al., 2011).

1.2.1 Molekulare Mechanismen der Tumorinvasion

Insbesondere der umfassende Prozess der Invasion des Primärtumors in das benachbarte Gewebe nimmt bei der Entstehung von malignen Tumoren und Metastasen eine Schlüsselposition ein. Nach Herauslösen einzelner Tumorzellen oder kleiner Tumorzellgruppen aus dem Zellverband des Primärtumors wachsen diese aktiv in das angrenzende Gewebe ein und zerstören dabei die normale Gewebestruktur (Engers und Gabbert, 1998; 2000; Friedl et al., 2004; Friedl und Wolf, 2003; Liotta und Stetler-Stevenson, 1991). Die Invasion zeichnet sich durch eine Penetration von Gewebegbarrieren wie z. B. der epithelialen Basalmembran aus, welche den Beginn von Malignität kennzeichnet (Friedl und Wolf, 2003; Mareel et al., 2009). Aus zellbiologischer Sicht erfordert dieser Vorgang eine Reihe verschiedener Schritte. Dazu gehören die Modifikation der Zellform und Steifheit, die Auflösung von Zell-Zellkontakten, die Ausbildung räumlich und zeitlich begrenzter Zell-Substratkontakte, eine gezielte enzymatische Degradation der extrazellulären Matrix (EZM) wie z. B. von Basalmembranen sowie eine aktive Tumorzellokomotion (Migration) (Engers und Gabbert, 2000; Friedl und Wolf, 2003; Liotta, 1986).

1.2.1.1 Tumorzelldissoziation

Neben der kollektiven Migration und Invasion in Form solider Zellstränge oder *Cluster* stellt die Invasion in Form dissoziierter Tumoreinzellen eine zweite wichtige Variante der Tumorinvasion dar (Friedl et al., 2004; Friedl und Wolf, 2003). Hierbei lösen sich einzelne maligne Zellen oder Zellgruppen im Rahmen einer Differenzierungsblockade aus ihrem Zellverband heraus, da die interzelluläre Adhäsion durch Auflösung von Zell-Zellkontakten vermindert wird (Engers und Gabbert, 1998; 2000; Friedl und Wolf, 2003; Gabbert, 1985). Auf molekularer Ebene ist in diesem Zusammenhang ein Komplex aus dem epithelialen Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, Cateninen und Proteinen des Zytoskeletts (z. B. Aktin) von entscheidender Bedeutung. Dieser Komplex wird als Suppressor der Tumorinvasion angesehen (Mareel et al., 1997). Er kann auf mehreren Ebenen reguliert werden: z. B. durch Herunterregulation der Expression oder Mutationen in E-Cadherin- oder Catenin-Genen bzw. biochemische Modifikationen wie etwa durch Phosphorylierung des β -Catenins (Birchmeier und Behrens, 1994; Mareel et al., 1997). In verschiedenen Studien konnte eine Korrelation zwischen der Herunterregulation der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion und dem Invasionspotenzial vieler Tumoren, beispielsweise kolorektaler Adenokarzinome, nachgewiesen werden (Birchmeier und Behrens, 1994). Die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zelladhäsion wird vor allem durch die kleinen Rho-ähnlichen GTPasen Rac1, ein Hauptregulator des Aktinzytoskeletts, und Cdc42 induziert (Engers, 2001; Hordijk et al., 1997; Kuroda et al., 1998).

1.2.1.2 Substratadhäsion

Während der Tumordinvasion spielen Interaktionen zwischen Tumorzellen und der extrazellulären Matrix (EZM) eine wichtige Rolle. Dabei ist eine dynamische Bildung und Auflösung von Zell-Substratkontakten notwendig (Mareel und Leroy, 2003).

Vor allem Integrine, eine Familie substratspezifischer Zelloberflächenrezeptoren, sind für die Vermittlung der Zell-Substratadhäsion verantwortlich (Engers und Gabbert, 2000; Friedl und Wolf, 2003). Sie verbinden Komponenten der EZM wie Laminin, Fibronectin und Kollagen über Adapterproteine mit inneren Zellstrukturen (z. B. dem Aktinzytoskelett), wodurch auch verschiedene biologische Funktionen - wie beispielsweise die Proliferation, Differenzierung und Apoptose - beeinflusst werden können (Engers und Gabbert, 2000; Friedl und Wolf, 2003; Giancotti und Ruoslahti, 1999; Ziober et al., 1996).

Laminin gehört zu einer Gruppe großer Glykoproteine und stellt eine Hauptkomponente von Basalmembranen dar. Integrinrezeptoren, welche an diese verschiedenen Laminin-Isoformen binden, besitzen eine besondere Funktion bei der Anheftung der Zellen an die Basalmembran (Castronovo, 1993; Engers und Gabbert, 2000; Ziober et al., 1996). Dadurch können Integrine Signale übermitteln, die das verankerungsabhängige Wachstum (*anchorage-dependent growth*) regulieren (Mareel und Leroy, 2003). Normalerweise erfolgt eine bestimmte Form der Apoptose (Anoikis), sobald es zum Verlust der Adhäsion adhärenter Zellen kommt (Schmitz et al., 2000). Interessanterweise konnten Veränderungen in zahlreichen lamininbindenden Integrinen während der Tumorprogression nachgewiesen werden (Engers und Gabbert, 2000; Ziober et al., 1996). Solche Veränderungen können u. a. zu einer verankerungsunabhängigen Zellproliferation führen, wobei diese ein wichtiges Kennzeichen von ektope Zellüberleben transformierter Zellen darstellt (Mareel und Leroy, 2003; Schmitz et al., 2000). Es wurden neben einer Herunterregulation der Integrinexpression in manchen Geweben auch eine vermehrte Expression spezifischer Integrine oder aber eine Änderung des Verteilungsmusters festgestellt. Diese Ergebnisse erscheinen zwar widersprüchlich, sind aber vor allem integrin- und tumortypspezifisch (Castronovo, 1993; Engers und Gabbert, 2000; Ray und Stetler-Stevenson, 1994; Ziober et al., 1996).

1.2.1.3 Proteolyse

Ein weiterer entscheidender Schritt der Tumordinvasion stellt die enzymatische Auflösung (Degradation) von extrazellulärer Matrix (EZM) durch Proteasen dar. Die EZM besteht hauptsächlich aus einem dichten Netzwerk aus Kollagenen, Laminin, Glykoproteinen und Proteoglykanen, wobei die subepitheliale Basalmembran insbesondere aus Kollagen Typ IV, Laminin und Heparansulfat-Proteoglykanen aufgebaut ist. Vor allem sogenannte Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind neben einer Reihe weiterer Proteasen für die Degradation

der EZM verantwortlich (Liotta und Stetler-Stevenson, 1991; Polette et al., 2004; Ray und Stetler-Stevenson, 1994; Stetler-Stevenson und Yu, 2001).

MMPs repräsentieren eine große Familie Zink-enthaltender Endopeptidasen. Vor allem die Gelatinasen MMP-2 (Gelatinase A, 72 kDa) und MMP-9 (Gelatinase B, 92 kDa) spielen eine bedeutende Rolle im Verlauf der Tumordinvasion, da sie Kollagen Typ IV abbauen können (Liotta und Stetler-Stevenson, 1991; Ray und Stetler-Stevenson, 1994; Stetler-Stevenson und Yu, 2001). In diversen menschlichen Tumoren kann eine vermehrte Expression von MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen werden, wobei diese Expression abhängig vom Tumortyp in den Tumorzellen selbst oder im angrenzenden reaktiven Tumorstroma stattfinden kann (Liotta und Stetler-Stevenson, 1991; Nelson et al., 2000; Stetler-Stevenson und Yu, 2001). Die Aktivität der MMPs wird unter anderem durch spezifische Inhibitoren, sogenannte *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*, auch TIMPs genannt, reguliert (Polette et al., 2004; Stetler-Stevenson und Yu, 2001). Das Verhältnis zwischen Pro-MMPs/aktivierten MMPs und freien TIMPs bestimmt die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen. Eine Änderung dieses Gleichgewichtes kann zu verschiedenen pathologischen Prozessen - beispielsweise zur Tumordinvasion - führen (Chirco et al., 2006; Engers et al., 1999; Ray und Stetler-Stevenson, 1994).

1.2.1.4 Migration

Im Rahmen der Tumordinvasion wird unter Migration (Lokomotion) eine auf dem Aktinfilamentsystem basierende aktive Fortbewegung maligner Zellen in enzymatisch eröffnete Geweberäume verstanden (Böcker et al., 2008; Liotta und Stetler-Stevenson, 1991). Unterschieden werden die Migration einzelner Zellen und die kollektive Migration in Form solider Zellstränge oder *Cluster* (Friedl und Wolf, 2003). Bei der Migration handelt es sich um einen komplexen, zyklischen Prozess, der durch die Ausbildung von Zellausstülpungen an der vorderen Plasmamembran charakterisiert ist (Engers und Gabbert, 2000; Friedl und Wolf, 2003; Lauffenburger und Horwitz, 1996). Diese entsprechen sogenannten Lamellipodien, Filopodien oder Pseudopodien, welche durch Aktinpolymerisation entstehen. Dabei sind die Aktinfilamente in den Filopodien zentral und länglich angeordnet, während Pseudopodien und Lamellipodien ein breiteres, orthogonal quervernetztes Aktinengeflecht aufweisen. Es handelt sich bei Lamellipodien, die der 2D-Variante von Pseudopodien entsprechen, um ganz flache, breite Zellvorstülpungen, die sich teilweise vom Substrat abheben und dadurch der Plasmamembran ein „gekräuselter“ Aussehen verleihen, das auch als *membrane ruffling* bezeichnet wird (Engers und Gabbert, 2000; Friedl und Wolf, 2003; Mitchison und Cramer, 1996; Stetler-Stevenson und Yu, 2001). Diese Zellausstülpungen haften durch Ausbildung von Zell-Substratkontakten an entsprechende Komponenten der EZM. Die weiteren Schritte sind eine Kontraktion des mittleren und hinteren Zellbereiches sowie eine Ablösung von Zellkontakten

in diesem Bezirk. Dadurch wird letztendlich eine aktive Bewegung der Zelle bewirkt (Engers und Gabbert, 2000; Friedl und Wolf, 2003; Lauffenburger und Horwitz, 1996; Mitchison und Cramer, 1996; Sheetz et al., 1999).

Für den Beginn und die Aufrechterhaltung der Migration sind Zellausstülpungen eine wichtige Voraussetzung. Daher kann die Beobachtung dieser Zellausstülpungen nützlich sein, um den Beginn von Zellmotilität zu überwachen (Friedl und Wolf, 2003). Das *membrane ruffling* hat sich jedoch nicht nur als eine wichtige Struktur in der Migration erwiesen, sondern es spielt auch eine Schlüsselrolle in der Tumordinvasion. Zellen mit starkem *ruffling* oder ausgeprägter Lamellipodienbildung werden daher häufig auch als Zellen mit einem invasiven Phänotyp bezeichnet. (Baugher et al., 2005; Engers und Gabbert, 2000; Schmitz et al., 2000).

Auf molekularer Ebene ist für die Regulation des Aktinzytoskeletts sowie Bildung von Zell-Zellkontakten bzw. Zell-Substratkontakten die Familie der Rho-GTPasen wesentlich verantwortlich (Engers und Gabbert, 2000; Mareel und Leroy, 2003; Schmitz et al., 2000). Während die Ausbildung von Lamellipodien und *membrane ruffling* größtenteils von der Rho-ähnlichen GTPase Rac vermittelt wird, induziert RhoA Stressfasern und Cdc42 sogenannte Filopodien (Spikes) (Keely et al., 1997; Mareel und Leroy, 2003; Ridley et al., 1992; Schmitz et al., 2000; Stetler-Stevenson und Yu, 2001). Auch verschiedene Wachstumsfaktoren können die Bildung dieser Zellausläufer hervorrufen, wobei endogene Rac-Proteine erforderlich zu sein scheinen (Ridley et al., 1992).

2 Das Prostatakarzinom

2.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist der häufigste maligne Tumor bei Männern in Nordamerika und Westeuropa. Für das Jahr 2012 wurde geschätzt, dass 29 % aller diagnostizierten Krebsneuerkrankungen in der männlichen Bevölkerung der USA durch das Prostatakarzinom bedingt sind. Mit einer Mortalität von 9 % ergibt sich hierdurch die zweithäufigste krebbsbedingte Todesursache bei Männern in den Vereinigten Staaten nach dem Bronchialkarzinom (Siegel et al., 2012). Diese Zahlen ähneln stark den geschätzten prozentualen Anteilen an Krebsneuerkrankungen und krebbsbedingten Todesfällen in Deutschland 2008. Allerdings stand hier das Prostatakarzinom bei den zu Tode führenden Tumorerkrankungen mit 10,5 % an dritter Stelle (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft-der-epidemiologischen-Krebsregister-in-Deutschland, 2012). Statistische Erhebungen deuten daraufhin, dass jeder 6. Mann in seinem Leben an einem invasiven Prostatakarzinom erkrankt und nur etwa jeder

30. Mann daran verstirbt (Jemal et al., 2008; Nelson et al., 2003). Für eine hohe Inzidenz in der männlichen Bevölkerung und eine lange klinisch stumme Phase dieses Karzinoms spricht, dass im Rahmen von Autopsiestudien bei 75 % aller Männer über 85 Jahren histologisch ein Prostatakarzinom nachgewiesen werden konnte (Gronberg, 2003; Sakr et al., 1993). Der klinische Verlauf des Prostatakarzinoms ist also extrem variabel. Im Hinblick auf die Therapie müssen daher langsam voranschreitende von aggressiven, metastasierenden, klinisch relevanten Verlaufsformen unterschieden werden (Schulz et al., 2003). 85 % der Männer, bei denen ein Prostatakarzinom diagnostiziert wird, sind älter als 65 Jahre. Personen vor dem 50. Lebensjahr erkranken dagegen nur sehr selten (<0,1 %) (Gronberg, 2003). Dieser Tumor ist daher überwiegend eine Krankheit älterer Männer. Das Prostatakarzinom kann ebenso wie viele andere Tumorarten in hereditäre und sporadische Formen unterteilt werden. Das Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, ist für Söhne und Brüder eines Patienten erheblich erhöht, wobei das Risiko steigt, je jünger der Patient zum Zeitpunkt der Diagnose ist (Bratt et al., 1999). Es konnten bislang allerdings keine bedeutenden pathologischen Unterschiede zwischen den beiden Tumorformen gefunden werden (Bastacky et al., 1995).

2.2 Risikofaktoren

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist immer noch überwiegend unklar. Verschiedene Faktoren werden für die Entstehung des Prostatakarzinoms in Erwägung gezogen. Dazu gehören vor allem die ethnische Herkunft, das Alter und die Familiengeschichte (Gronberg, 2003). Aber auch die Ernährung, der Lebensstil, Umweltfaktoren sowie Androgene scheinen eine Rolle zu spielen (Nelson et al., 2003).

2.3 Klinik und Diagnostik

97 % der Prostatakarzinome sind Adenokarzinome, die in ca. 60-90 % der Fälle ein multifokales Wachstumsmuster aufweisen (Alken und Walz, 1998; Andreoiu und Cheng, 2010) und eine bemerkenswerte Heterogenität besitzen (Karan et al., 2003). Das Prostatakarzinom schreitet im Verlauf von einem frühen, androgenabhängigen, organbegrenzten Tumor zu einer höchst invasiven, androgenunabhängigen, metastasierenden Erkrankung fort (Karan et al., 2003).

Klinisch bleibt das Prostatakarzinom lange asymptomatisch. Erst im fortgeschrittenen Stadium treten Miktionsstörungen, Hämaturie oder Schmerzen durch Knochenmetastasen auf. Um die Tumorerkrankung möglichst im Frühstadium zu erkennen, sind eine digital-rektale Untersuchung und die Bestimmung des Serumspiegels des prostataspezifischen Antigens

(PSA) im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen empfehlenswert (Schmid et al., 2004). Das PSA ist ein Glykoprotein, das fast ausschließlich in der Prostata gebildet wird (Schmid et al., 2004). Nur ein kleiner Anteil erreicht das Blutgefäßsystem, wobei die Serumkonzentration vom Prostatavolumen abhängt. Bei Vorliegen eines Prostatakarzinoms steigt der PSA-Spiegel an, wobei die Werte üblicherweise über 4-10 ng/ml liegen. Allerdings kann die Konzentration z. B. auch durch eine benigne Prostatahyperplasie (BPH) oder entzündliche Prozesse in der Prostata erhöht sein. Auf der anderen Seite zeigen schätzungsweise ein Viertel der Patienten mit einem Prostatakarzinom keine PSA-Erhöhung, sodass sie sich somit einer PSA-basierten Entdeckung entziehen (Schmid et al., 2004; Schulz, 2005). Dadurch entsteht eine große Grauzone. Das bedeutet, dass es sich beim Serum-PSA zwar um einen wichtigen diagnostischen Marker für das Prostatakarzinom handelt, der auch zur Verlaufskontrolle genutzt wird, allerdings ist er weder ein völlig spezifischer noch sehr sensibler Tumormarker (Schmid et al., 2004; Schulz, 2005). Die Einführung des PSA-Screenings hat damit die Früherkennung des Prostatakarzinoms im Hinblick auf eine Erfolg versprechende kurative Therapie stark verändert. Auf der anderen Seite ist eine Unterscheidung zwischen häufig asymptomatisch verlaufenden und der kleinen Menge sich klinisch manifestierender Tumoren nicht möglich (Schmid et al., 2004; Schulz, 2005).

Neben dem Serumlevel des präoperativen PSA werden auch klinische Parameter wie das Tumorstadium und der *Gleason-Score* zur Einschätzung des Progressionsrisikos zum Zeitpunkt der Diagnose eingesetzt (Engers et al., 2007; Partin et al., 1997). Allerdings sind all diese Parameter nicht ausreichend präzise genug, um eine optimale Behandlung gewährleisten zu können (Engers et al., 2007; Ross et al., 2003). Hier besteht also ein großer Bedarf an weiteren Biomarkern mit prognostischer Relevanz, die Aufschluss über die Aggressivität des Tumors geben, um die Patienten mit der geeignetsten Therapie behandeln zu können (Bickers und Aukim-Hastie, 2009; Engers et al., 2007).

Bei einem verdächtigen Tastbefund und einem erhöhten PSA-Wert ist die transrektale Endosonographie zur weiteren Diagnostik möglich. Für die Bestätigung der Diagnose bleibt allerdings eine histologische Untersuchung von Biopsien zwingend notwendig, welche in der Regel als Gewebestanzungen unter sonographischer Kontrolle entnommen werden (Borley und Feneley, 2009).

2.4 TNM-Klassifikation und Grading

Mithilfe der TNM-Klassifikation (*Staging*) wird das Tumorstadium bestimmt. T (Tumor) beschreibt dabei die Ausdehnung des Primärtumors, N (*Nodus*) das potenzielle Auftreten regionärer Lymphknotenmetastasen bzw. M (Metastasen) das Vorhandensein von Fernmetastasen. Zu Beginn zeichnen sich die Prostatakarzinome durch ein lokal begrenztes,

infiltrierendes Wachstum innerhalb der Prostata (T1-T2) aus. Das Durchbrechen der Prostatakapsel und die Infiltration der Samenblase (T3) oder benachbarter Strukturen (T4) zeigen ein lokal fortgeschrittenes Wachstum an. Bei der lymphogenen Metastasierung sind die iliakalen, retroperitonealen und paraaortalen Lymphknoten betroffen, während die hämatogene Metastasierung bevorzugt in das Skelettsystem erfolgt (Böcker et al., 2004; Cheng et al., 2012; UICC, 2010).

Neben dem Tumorstadium wird der Differenzierungsgrad als wichtiger Prognosefaktor angesehen (Engers et al., 2007; Epstein, 2010; Iczkowski und Lucia, 2011). Allerdings werden häufig verschiedene histologische Wachstumsmuster nebeneinander gefunden, die eine prognostisch ausgerichtete Klassifizierung erschweren (Böcker et al., 2001; Epstein, 2010). In dem modifizierten *Grading-System* nach Gleason, welches 2005 in einer Konsensuskonferenz überarbeitet wurde, werden dem häufigsten und aggressivsten Wachstumsmuster in einer Biopsie Werte zwischen 1 bis 5 zugeteilt. Je höher dieser Wert ist, desto größer ist der Grad der Entdifferenzierung. Durch Addition der Zahlenwerte ergibt sich der sogenannte *Gleason-Score* (Epstein, 2010; Iczkowski und Lucia, 2011). Bei der UICC werden die Grade G1-G4 mit abnehmender Differenzierung unterschieden (UICC, 2010).

2.5 Therapie

Das Prostatakarzinom wird stadienabhängig therapiert. Dabei wird das therapeutische Vorgehen individuell in Abhängigkeit vom Tumorstadium, dem histologischen Differenzierungsgrad, dem PSA-Wert, aber auch von der Lebenserwartung und der Symptomatik bestimmt (Payne und Mason, 2011). Im lokal begrenzten Zustand wird die radikale Prostatektomie angestrebt, wobei auch die Strahlentherapie eine weitere Option darstellt. Mithilfe dieser Maßnahmen kann die Erkrankung potenziell kurativ mit ausgezeichneten Überlebenschancen behandelt werden, wohingegen im fortgeschrittenen Stadium bzw. bei Metastasenbildung in der Regel eine palliative Hormontherapie angewendet wird (Payne und Mason, 2011). Zunächst handelt es sich beim Prostatakarzinom um einen androgen-abhängigen Tumor, der durch eine Androgendeprivation (durch Orchiektomie, Antiandrogene oder LHRH-Analoga) im Wachstum verlangsamt wird bzw. zu einer Tumorregression führt (Böcker et al., 2001; Payne und Mason, 2011). Allerdings können die Patienten dadurch nicht geheilt werden. Anfangs sprechen etwa 80 % der Patienten auf diese Behandlung an, aber nach ca. 12-33 Monaten geht der Tumor fast immer in ein hormonunabhängiges Karzinom mit erhöhter Aggressivität und stärkerer metastasierender Eigenschaft der Tumorzellen über (Rizzo et al., 2005). Die Überlebensdauer von Patienten mit einem hormonrefraktären Adenokarzinom beträgt im Durchschnitt nur ungefähr 12 Monate (Trachtenberg und Blackledge, 2002). Um neue therapeutische Optionen entwickeln zu können, besteht daher ein

dringendes Bedürfnis, die Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms auf molekularer Ebene zu verstehen.

2.6 Prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN)

Im Hinblick auf die Entstehung des Prostatakarzinoms ist die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN) hervorzuheben (Bostwick et al., 2004; Zynger und Yang, 2009). Hierbei handelt es sich um eine dysplastische Veränderung des sekretorischen Prostataepithels, bei der die Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns verlagert ist, bei der allerdings die Basalzellschicht im Gegensatz zum Karzinom erhalten bleibt. Es wird zwischen einer sogenannten *high-grade* (HG-PIN) und *low-grade* (LG-PIN) PIN unterschieden. Während die LG-PIN als klinisch bedeutungslose Veränderung angesehen wird, handelt es sich bei der HG-PIN höchstwahrscheinlich um die bedeutendste Vorstufe des Prostatakarzinoms (Bostwick et al., 2004; Karan et al., 2003; Zynger und Yang, 2009). Innerhalb von 10 Jahren entwickelt sich bei den meisten Patienten mit HG-PIN ein Prostatakarzinom, so dass diese präneoplastische Läsion auch als Indikatorläsion mit einem hohen prädiktiven Wert (23-28 %) angesehen wird (Bostwick et al., 2004). Während bislang im Alltag zwar keine Therapie der HG-PIN vorhanden ist, rechtfertigt der Nachweis unter bestimmten Bedingungen allerdings eine Re-Biopsie bzw. erfordert eine strenge diagnostische Nachsorge, um ein gleichzeitig vorliegendes oder sich erst im Verlauf entwickelndes invasives Adenokarzinom zu erkennen (Bostwick et al., 2004). Die HG-PIN kann bislang nur mit einer Biopsie nachgewiesen werden, da der Serum-PSA-Wert nicht signifikant erhöht ist und auch in der Sonographie keine Veränderung sichtbar wird (Bostwick et al., 2004; Zynger und Yang, 2009). Auffällig ist die enge räumliche und biologische Beziehung zwischen dem invasiven Karzinom und der HG-PIN, da die präneoplastische Vorläuferläsion ebenfalls meist multizentrisch auftritt und vor allem in der peripheren Zone der Prostata gefunden wird (Bostwick et al., 2004). Auch auf molekularer Ebene weist die HG-PIN sehr viele genetische Veränderungen auf, die ebenso beim Prostatakarzinom vorliegen (Emmert-Buck et al., 1995). Zum Beispiel identifizierten Calvo et al. (2002) sowohl in der präneoplastischen Läsion als auch beim invasiven Karzinom über 400 abnorm exprimierte Gene. Die HG-PIN ist mit zunehmenden Veränderungen des Phäno- und Genotyps assoziiert, welche sich in einem Stadium zwischen denen des benignen sekretorischen Epithels und denen des Prostatakarzinoms befinden. Dies macht deutlich, dass die Prostatakarzinogenese mit einer zunehmenden Beeinträchtigung der Zelldifferenzierung und regulatorischer Kontrollmechanismen einhergeht (Bostwick et al., 2004).

2.7 Molekulare Grundlagen

Das Prostatakarzinom ist mittlerweile der häufigste maligne Tumor bei Männern in den westlichen Industrienationen und stellt ein großes Gesundheitsproblem dar. Umso größer ist die Hoffnung, dass durch das Verstehen der molekularen Mechanismen der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms bessere Möglichkeiten zur Prävention, Diagnosestellung, prognostischen Evaluation und Therapie entwickelt werden können (Schulz et al., 2003). Vor allem drei Aufgaben werden in den Mittelpunkt der klinisch orientierten Forschung gestellt (Schulz und Hoffmann, 2009):

- (1) die frühzeitige Entdeckung des Tumors,
- (2) die Unterscheidung, ob ein lokal begrenzter Tumor vorliegt, der entweder latent und rezidivfrei verläuft oder der wahrscheinlich eher als aggressive Erkrankung fortschreiten wird und

- (3) die Entwicklung effektiver Therapien für lokal fortgeschrittene und metastasierte Fälle.

Die Erwartungen, die in die Molekularbiologie dieses Tumors gesetzt werden, sind demnach sehr groß. Die entscheidende Grundlage hierfür ist zu wissen, welche molekularen Ereignisse für die Initiation und Progression des Prostatakarzinoms verantwortlich sind.

Die Pathogenese des Prostatakarzinoms stellt - ebenso wie bei vielen anderen menschlichen Tumoren - ein Zusammenspiel genetischer und epigenetischer Veränderungen dar (Schulz und Hoffmann, 2009). Hierbei spielt die Anhäufung verschiedener genetischer Defekte entweder auf Nukleotidebene (z. B. als Insertion, Deletion, Punktmutation) oder auf chromosomaler Ebene (wie Verluste oder Zugewinne ganzer Chromosomen oder Chromosomenteile) eine wichtige Rolle (Karan et al., 2003).

2.7.1 Bedeutung hereditärer Prostatakarzinome

In anderen Neoplasien führte die Untersuchung hereditärer Tumorsyndrome zur Identifizierung entscheidender Gene. Dies gestaltete sich beim Prostatakarzinom viel komplizierter (Schulz et al., 2003). Immerhin konnten in Untersuchungen verschiedene Regionen im Genom definiert werden, die hereditäre Prostatakarzinomgene enthalten sollten (Nwosu et al., 2001; Simard et al., 2002), allerdings konnten nur wenige Regionen auch in mehreren Studien bestätigt werden (Schulz et al., 2003). Dies lässt darauf schließen, dass das erhöhte Erkrankungsrisiko bei familiär gehäuftem Auftreten des Prostatakarzinoms nicht durch ein einzelnes oder ein paar wenige Hochrisikogene bedingt ist. Stattdessen scheinen verschiedene Gene, das Risiko zu beeinflussen (Schulz, 2005). Diese hereditären Prostatakarzinomgene agieren dabei nicht wie klassische Tumorsuppressorgene, wie beispielsweise RB1 oder APC, sondern regulieren das Tumorrisiko möglicherweise durch Interaktion mit unbekannten exogenen Faktoren (Schulz, 2005; Schulz und Hatina, 2006).

Am besten reproduzierbar sind Mutationen in der Region 1q24-25, welche auch HPC1 (*hereditary prostate cancer 1*) genannt wird. Es hat sich herausgestellt, dass diese Region höchstwahrscheinlich das RnaseL-Gen, *RNASEL*, codiert (Schulz et al., 2003). Das RnaseL-Protein ist eine Endoribonuklease, die an einem Abwehrmechanismus gegen virale RNA beteiligt ist. Inaktivierende Mutationen und bestimmte Polymorphismen dieses Gens scheinen mit einem erhöhten Prostatakarzinomrisiko einherzugehen (Schulz, 2005; Silverman, 2003).

2.7.2 Wichtige molekulare Veränderungen

In Karzinomen akkumulieren verschiedene genetische Veränderungen, die in der Lage sind, Protoonkogene zu aktivieren und Tumorsuppressorgene zu inaktivieren. Im Gegensatz zu frühzeitigen Stadien des Prostatakarzinoms, die häufig noch euploid verlaufen, sammeln sich in fortgeschrittenen Fällen numerische und strukturelle chromosomale Veränderungen an (Schulz et al., 2003). Anfangs überwiegen Deletionen (Verluste) chromosomaler Segmente, wohingegen Zugewinne und Amplifikationen in fortgeschritteneren Stadien öfter vorkommen (Dong, 2001; Nupponen und Visakorpi, 1999; Schulz et al., 2003). Die häufigsten veränderten Autosomen im Prostatakarzinom sind in abnehmender Reihenfolge 8, 13, 7, 10, 16, 6 und 17. Häufig liegen auch Zugewinne und Amplifikationen von Teilen des X-Chromosoms sowie Verluste des Y-Chromosoms vor (Hyytinen et al., 1999; Latil et al., 1999; Schulz et al., 2003). In zahlreichen Studien war die Untersuchung etablierter Tumorsuppressorgene, die sonst in anderen Tumorarten eine große Rolle spielen, beim Prostatakarzinom nur mäßig erfolgreich. Daher erfolgte die Suche nach Schlüsselgenen in solchen Regionen des Genoms, welche durch reproduzierbare Deletionen gekennzeichnet sind (Schulz et al., 2003).

Es zeigte sich, dass sowohl p53, bekannt als sogenannter „Wächter des Genoms“, als auch *PTEN* bei der Progression des Prostatakarzinoms beteiligt sind. Auch das *RB1*-Gen scheint ebenso wie *CDKN2A* (p16) und *CDKN1B* (p27) eine gewisse Rolle als Tumorsuppressorgen beim Prostatakarzinom zu spielen (Karan et al., 2003; Schulz et al., 2003). Da bewährte Tumorsuppressorgene jedoch nur eingeschränkt beteiligt sind und Verluste spezifischer chromosomaler Regionen wiederholt nachgewiesen werden können, liegt der Gedanke nahe, dass gewebespezifische Tumorsuppressorgene eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Prostatakarzinoms spielen könnten (Schulz et al., 2003).

Am häufigsten ist das Chromosom 8 von genetischen Veränderungen betroffen (Sequenzverluste von 8p und Zugewinne von 8q). In verschiedenen Studien konnten in mehr als der Hälfte aller Prostatakarzinome eine Verringerung der Kopienzahl bzw. ein Heterozygotieverlust (LOH) des Chromosomenarms 8p nachgewiesen werden. Dies wird als ein frühes Ereignis in der Tumorigenese betrachtet, da auch in intraepithelialen Neoplasien der Prostata (PIN) diese Veränderungen festgestellt werden konnten (Nupponen et al., 1998; Schulz et al.,

2003). Daher wurden viele Versuche zur Identifizierung möglicher Kandidatengene auf Chromosom 8p unternommen. Als interessantestes Kandidatengen hat sich dabei der prostataspezifische Transkriptionsfaktor NKX3.1 auf 8p21 herausgestellt (Schulz et al., 2003). NKX3.1 spielt eine wichtige Rolle bei der normalen Differenzierung des Prostataepithels und wird durch Androgene induziert. Der Funktionsverlust dieses Faktors soll ein initiales Ereignis in der Prostatakarzinogenese darstellen (Shen und Abate-Shen, 2003).

Insbesondere beim Prostatakarzinom weisen viele Tumorsuppressorgene, wie beispielsweise *RB1*, *PTEN* und *NKX3.1*, ein auffälliges Verhalten auf. Obwohl der Verlust eines Allels häufig vorkommt, treten Inaktivierungen beider Allele durch Mutationen, homozygote Deletionen oder Promotor-Hypermethylierungen eher selten auf und sind dann auf weit fortgeschrittene Tumoren beschränkt. Dennoch ist die Expression dieser Gene oft vermindert oder geht verloren. Eine Erklärung für diese Beobachtungen bietet die Haploinsuffizienz von Tumorsuppressorgenen – zumindest während früher Stadien (Schulz und Hatina, 2006).

Ebenfalls gab es bereits verschiedenste Studien zur Untersuchung etablierter Onkogene, die in anderen Tumoren eine wichtige Rolle spielen, um Aufschluss über die Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms zu erlangen. Allerdings waren diese Analysen bislang auch nur mäßig erfolgreich und es konnte kein spezifisches Onkogen gefunden werden. Die einzigen Onkogene, die eine gewisse Beachtung im Hinblick auf das Prostatakarzinom erregten, sind c-MYC, c-ErbB2 (Her2/Neu), Bcl2 und Ras (Karan et al., 2003; Schulz et al., 2003). Während eine veränderte Expression mehrerer Protoonkogene zur Prostatakarzinogenese beiträgt, werden aktivierende Mutationen, z. B. des Ras-Onkogens, dagegen viel seltener gefunden (Karan et al., 2003; Schulz et al., 2003).

Vor einigen Jahren konnte durch eine bioinformatische Methode eine neue Genfusion beim Prostatakarzinom identifiziert werden. Es handelt sich dabei um das androgenregulierte Gen *TMPRSS2*, welches mit Genen der *ETS*-Gengruppe fusioniert. *ETS*-Gene gehören zur Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die u.a. in der onkogenen Transformation von Weichgewebetumoren und Leukämien eine Rolle spielen. Diese Genfusion führt zur Überexpression von Mitgliedern der *ETS*-Genfamilie und ist in ca. der Hälfte klinisch auffälliger Prostatakarzinome nachweisbar. Sie stellt ein frühes Ereignis bei der Entstehung des Prostatakarzinoms dar (Perner et al., 2007).

Auch epigenetische Mechanismen spielen bei der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms eine zentrale Rolle (Schulz und Hoffmann, 2009). Die auffälligsten Veränderungen betreffen die DNA-Methylierung, wodurch Signalwege beeinträchtigt werden, welche unter anderem die DNA-Reparatur, Tumorsuppressorgene, die Zellzykluskontrolle, die Tumorzellinvasion und die Metastasierung betreffen (Li et al., 2004). Bislang sind mehr als 50

Gene mit DNA-Hypermethylierung bekannt, allerdings sind nur wenige in verschiedenen Studien reproduzierbar (Li et al., 2004; Schulz und Hoffmann, 2009).

2.8 Rac3 und Tiam1 als prognostisch relevante Marker

Da die klinisch relevanten Marker beim Prostatakarzinom bislang nicht ausreichend präzise genug sind, um eine optimale Diagnostik und Therapie gewährleisten zu können (Ross et al., 2003), besteht ein großer Bedarf an weiteren Biomarkern mit prognostischer Relevanz, die Aufschluss über die Aggressivität dieses Tumors geben (Bickers und Aukim-Hastie, 2009; Engers et al., 2007). In vorausgegangenen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit konnte erstmals durch semiquantitative Immunhistochemie gezeigt werden, dass die Rho-ähnliche GTPase Rac wie auch der Rac-spezifische Aktivator Tiam1 sowohl im Prostatakarzinom als auch in der *high-grade* prostatic intraepithelial Neoplasie (HG-PIN) signifikant stärker exprimiert werden als im normalen sekretorischen Epithel (Engers et al., 2006a; Engers et al., 2007). Diese Überexpressionen korrelierten signifikant mit einem aggressiven klinischen Verlauf und einem verkürzten rezidivfreien Überleben. Zusätzliche Untersuchungen ergaben, dass die prognostisch relevante Überexpression der Rac-GTPase in Prostatakarzinomen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene überwiegend aus der gesteigerten Expression der Rac3-Isoform resultiert. Da keine Unterschiede in den Rac- und Tiam1-Expressionsleveln von Prostatakarzinomen und prämaligen HG-PIN-Läsionen festgestellt werden konnten, scheint die erhöhte Expression dieser Proteine frühzeitig in der Entstehung des Prostatakarzinoms aufzutreten (Engers et al., 2006a; Engers et al., 2007). Bei Beachtung des transformierenden Potenzials von Rac1 und Rac3 in anderen Zelltypen lassen diese Ergebnisse vermuten, dass der Rac-Signalweg eine wichtige Rolle in der Prostatakarzinogenese spielen könnte (Joyce und Cox, 2003; Qiu et al., 1995; Servitja et al., 2003). Zwar bedeutet eine gesteigerte Rac-Expression nicht unbedingt auch eine erhöhte Aktivität von Rac, allerdings korrelierte die Überexpression von Rac in diesen Untersuchungen signifikant mit einer starken Tiam1-Überexpression. Die Tatsache, dass Tiam1 ein Rac-spezifischer Aktivator ist, lässt daher vermuten, dass die erhöhte Rac-Expression - zumindest in der untersuchten Kohorte - wahrscheinlich auch eine erhöhte Rac-Aktivität widerspiegelte (Engers et al., 2007).

Aufgrund dieser Ergebnisse war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die funktionelle Relevanz von Rac3 und Tiam1 für die Entstehung des Prostatakarzinoms zu untersuchen.

3 Der Tiam1/Rac-Signalweg

3.1 Die Rho-ähnliche GTPase Rac

Rac-Proteine gehören ebenso wie RhoA und Cdc42 zur Familie der Rho-ähnlichen GTPasen, welche wiederum eine Untergruppe der Ras-Superfamilie darstellen. Die Rho-Proteine (*Ras homologous*) spielen eine entscheidende Rolle bei diversen zellulären Prozessen, wobei insbesondere die Organisation des Aktinzytoskeletts, die Regulation der Gentranskription und die Kontrolle des Zellwachstums, der Zelladhäsion sowie der Migration zu nennen sind (Hall, 1998; Malliri und Collard, 2003; Ridley, 2004; Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997). Dadurch spielen sie eine wesentliche Rolle in der onkogenen Transformation, Tumordinvasion und Metastasierung (Baughner et al., 2005; Chan et al., 2005; Engers et al., 2007; Malliri und Collard, 2003; Ridley, 2004; Schmitz et al., 2000).

Rho-ähnliche GTPasen agieren als molekulare Schalter, die zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand wechseln können (Abb. I.3). Ihre Aktivität wird im Wesentlichen durch drei verschiedene Proteingruppen streng reguliert. Der Austausch von GDP durch GTP wird durch sogenannte Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs) katalysiert. Die Rho-GEFs werden durch Stimulation von Oberflächenrezeptoren, wie z. B. Rezeptor-Tyrosinkinasen, G-Proteingekoppelte Rezeptoren und Adhäsionsrezeptoren wie Integrine und Cadherine, aktiviert. Der Nukleotidaustausch führt zu einer Konformationsänderung der GTPasen, wodurch die Bindung an verschiedene Effektormoleküle möglich wird. Dies wiederum bewirkt die Aktivierung zahlreicher nachgeschalteter Signalwege. Im Gegensatz hierzu stimulieren GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die intrinsische GTP-Hydrolyse und führen somit zu einer Inaktivierung bzw. Aufhebung der Signalübertragung. Inaktive GDP-gebundene Rho-GTPasen können an Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) binden, wodurch sie von der Zellmembran entfernt werden. Im Zytoplasma ist dann allerdings ein Nukleotidaustausch durch die membranassoziierten Rho-GEFs nicht mehr möglich (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Hall und Nobes, 2000; Malliri und Collard, 2003; Mertens et al., 2006; Sander und Collard, 1999).

Grundsätzlich ist eine Regulation der Aktivität der Rho-ähnlichen GTPasen durch Kontrolle ihrer subzellulären Lokalisation, durch Veränderung ihrer Expression, durch aktivierende Mutationen des Proteins sowie durch Veränderung der Regulatoren möglich (Bustelo et al., 2007; Sun et al., 2006). So kann beispielsweise die Aktivität von Rac durch eine Heraufregulation der GEF-Aktivität oder aber durch eine Verminderung der GDI-Proteinlevel

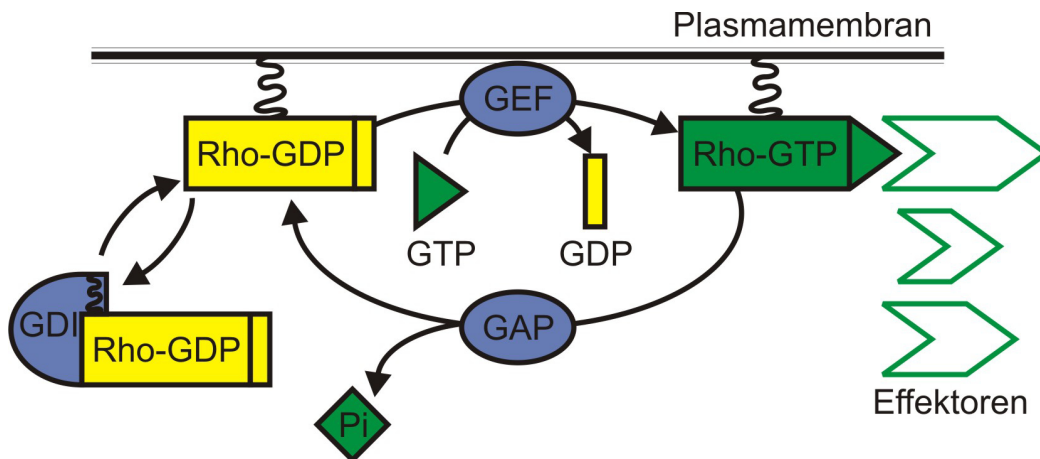


Abb. I.3 Modell des Rho-GTPase Zyklus

Rho-Proteine können zwischen einem inaktiven GDP-gebundenem und einem aktiven GTP-gebundenem Zustand wechseln. Die Übergänge zwischen diesen beiden Stadien werden durch GEFs (Guaninnukleotid-Austauschfaktoren), GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) und GDIs (Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren) kontrolliert. Für Details siehe Text. Pi: Phosphat. Die Abbildung wurde modifiziert nach Etienne-Manneville und Hall (2002).

gesteigert werden (Sun et al., 2006). Auch fehlende oder funktionsgestörte GAP-Proteine könnten diesen Effekt bewirken (Mira et al., 2000).

Im menschlichen Genom sind drei verschiedene Rac-Proteine bekannt: das ubiquitär exprimierte Rac1, das hämatopoesespezifische Rac2 und das am wenigsten charakterisierte Rac3 (Engers et al., 2007). Obwohl sie von verschiedenen Genen kodiert werden, ist die Aminosäuresequenz von Rac3 in einem hohen Grad mit der von Rac1 (in 92 %) und Rac2 (in 89 %) identisch (Haataja et al., 1997; Hajdo-Milasinovic et al., 2007; Wennerberg und Der, 2004). Regionen, die hauptsächlich für die Effektoren-Bindung sowie für den Nukleotid-austausch verantwortlich sind, stimmen zwischen Rac1 und Rac3 überein. Trotz starker Homologien unterscheiden sie sich allerdings am carboxyterminalen Ende. Die letzten drei Aminosäuren dieser Region, welche auch als CAAX-Box bezeichnet werden, sind für die Isoprenylierung und damit für die Membranlokalisierung der Rac-Proteine verantwortlich. Zudem ist auch die Aminosäuresequenz in der sogenannten „Polybasischen Region“ (PBR), welche der CAAX-Box direkt vorgelagert ist und als zusätzliche Bindungsstelle für Effektoren oder GEFs dienen kann, verschieden (Haataja et al., 1997; Hajdo-Milasinovic et al., 2007).

Während Rac1 ubiquitär vorhanden ist, wird Rac3 am stärksten im Gehirn exprimiert. Außerdem wird es in geringeren Mengen auch in einigen anderen Organen, wie der Plazenta, dem Herzen oder dem Pankreas, gefunden (Haataja et al., 1997). Eine ver-

gleichende funktionelle Analyse von Rac1 und Rac3 zeigte bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften wie der Effektorinteraktion, der Nukleotidbindung sowie der Hydrolyse eine sehr starke Ähnlichkeit, wobei insbesondere der Tiam1-induzierte Nukleotidaustausch dieser beiden GTPasen vergleichbar ist (Haeusler et al., 2003).

Aufgrund der unterschiedlich starken Expression in den Geweben und der Sequenzunterschiede, welche die subzelluläre Lokalisation bzw. die Bindung spezifischer regulatorischer Moleküle betreffen, besitzen die verschiedenen Rac-Isoformen *in vivo* auch bestimmte spezialisierte regulatorische Funktionen (Haataja et al., 1997; Hajdo-Milasinovic et al., 2009; Mira et al., 2000). So konnten beispielsweise Hajdo-Milasinovic et al. (2007) eine gegensätzliche Funktion von Rac1 und Rac3 in der Adhäsion und Differenzierung neuronaler Zellen nachweisen.

3.2 Tiam1 als Rac-spezifischer Aktivator

Tiam1 ist ein Beispiel für einen gut untersuchten Rac-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktor. Das Tiam1-Gen (*T-Lymphoma invasion and metastasis*) wurde 1994 in einer murinen T-Lymphomzelllinie bei der Suche nach neuen invasions- und metastasierungsrelevanten Genen identifiziert (Habets et al., 1994). 1995 wurde das humane Tiam1-Homolog auf Chromosom 21 (21q22.1) beschrieben, welches mit dem murinen Tiam1-Genprodukt in einem hohen Grad identisch ist (Chen und Antonarakis, 1995; Habets et al., 1995; Mertens et al., 2003). Isolierte invasive Zellklone wiesen entweder eine erhöhte Expression des normalen Volllängen-Proteins (FL-Tiam1) auf oder aber zeigten die Expression einer am N-Terminus verkürzten Mutante von Tiam1. Diese bestand aus den C-terminalen 1199 Aminosäuren und wurde deshalb C1199-Tiam1 genannt (Engers, 2001; Engers et al., 2000; Habets et al., 1994; Michiels et al., 1997; van Leeuwen et al., 1995). Tiam1 wird in nahezu allen adulten Geweben gering exprimiert, mit besonders hoher Expression in Gehirn, Hoden und Epidermis. Verschiedene maligne Tumorzelllinien bzw. Tumorgewebe (z. B. Prostata- oder Nierenzellkarzinome) weisen zudem eine Überexpression von Tiam1 auf (Engers et al., 2006a; Engers et al., 2000; Habets et al., 1994; Mertens et al., 2006; Minard et al., 2004). Es handelt sich beim Tiam1-Protein um einen spezifischen GEF und damit Aktivator der Rho-ähnlichen GTPase Rac. Durch Aktivierung weiterer nachfolgender Signalwege ist Tiam1 an der Regulation verschiedener zellulärer Funktionen beteiligt. Dazu gehören beispielsweise eine zelltyp- und substratabhängige Beeinflussung der Migration, Invasion und Zelladhäsion. Tiam1 wird außerdem eine wichtige Rolle in der Progression und Metastasierung maligner Tumore zugeschrieben (Hordijk et al., 1997; Mertens et al., 2005; Michiels et al., 1995; Minard et al., 2004).

3.2.1 Struktur von Tiam1

Auf Proteinebene besteht Tiam1 aus 1591 Aminosäuren und besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 177 kDa. Als größtenteils hydrophiles Protein ist es hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (Habets et al., 1994; Mertens et al., 2003). Tiam1 enthält mehrere funktionelle Domänen, wobei insbesondere die C-terminal lokalisierte Kombination aus den beiden „Dbl-homologen-Pleckstrin-homologen“-Domänen (DH-PHc) charakteristisch ist (Abb. I.4) (Mertens et al., 2006). Diese Kombination ist ein Kennzeichen von Aktivatoren Rho-ähnlicher GTPasen, welche Mitglieder der Dbl-ähnlichen Familie von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren sind und zu denen auch Tiam1 gehört (Mertens et al., 2006). Die DH-PHc-Region ist als katalytische Region für den Nukleotidaustausch verantwortlich (Mertens et al., 2003).

Neben der C-terminal lokalisierten PH-Domäne (PHc) gibt es auch eine zweite, N-terminal gelegene PH-Domäne (PHn). Diese bildet zusammen mit einer angrenzenden mutmaßlichen *Coiled-coil-Region* (CC) und einer sich daran anschließenden sogenannten *Extended-Domäne* (Ex) eine Funktionseinheit. Diese gesamte als PHn-CC-Ex bezeichnete Region ist für die Lokalisation von Tiam1 an der Plasmamembran verantwortlich (Fleming et al., 2004; Mertens et al., 2003; Stam et al., 1997). Die Membranassoziation ist dabei sowohl für die

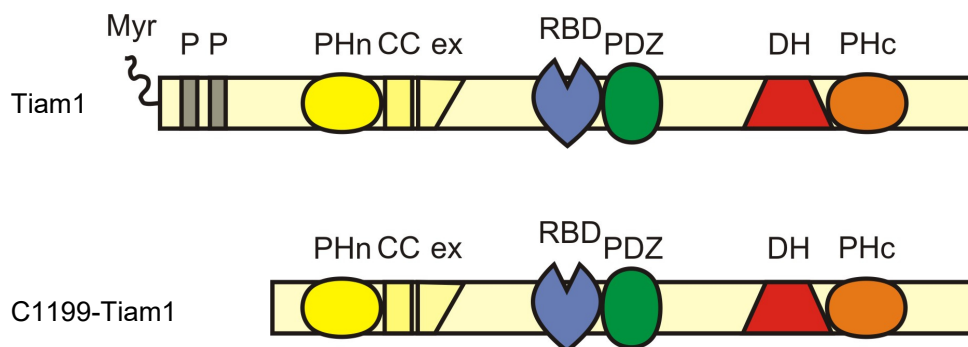


Abb. I.4 Struktureller Aufbau des Tiam1-Proteins im Vergleich zu C1199-Tiam1

Das Vollständigkeitsprotein Tiam1 ist aus verschiedenen funktionellen Domänen aufgebaut: Myr: Myristoylierungsstelle, P: PEST-Domäne, PHn: N-terminale *Pleckstrin homology*-Domäne, CC: *coiled-coil*-Region, ex: *extended*-Domäne, RBD: Ras-bindende Domäne, PDZ: „PSD-95/DlgA/ZO-1“-Domäne, DH: *Dbl-homology*-Domäne, PHc: C-terminale *Pleckstrin homology*-Domäne. Bei C1199-Tiam1 dagegen handelt es sich um eine N-terminal *trunkierte* Mutante von Tiam1. Im Vergleich zur vollständigen Tiam1-Sequenz fehlen die Myristoylierungsstelle und die beiden PEST-Domänen. Die für die Membrantranslokation verantwortliche PHn-CC-Ex-Domäne, die Ras-bindende Domäne sowie die für die katalytische Aktivität erforderliche DH-PHc-Domäne sind dagegen vorhanden (Abbildungen modifiziert nach Mertens et. al., 2006).

Rac-vermittelte Induktion des *membrane ruffings* als auch für die Stimulation der c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK) notwendig (Michiels et al., 1997). N-terminal findet sich außerdem neben zwei PEST-Domänen eine potenzielle Myristoylierungsstelle, die als Lipidanker dient und Tiam1 vermutlich an der Plasmamembran stabilisiert (Mertens et al., 2003). Die PEST-Domänen werden mit einer Proteininstabilität assoziiert, da sie der Degradation von Proteinen dienen. Die Deletion dieser Domänen - wie beispielsweise bei C1199-Tiam1 vorhanden (Abb. I.4) – führt zu einer vermehrten Stabilität und dadurch zu einer gesteigerten GEF-Aktivität im Vergleich zu FL-Tiam1 (Mertens et al., 2003; Minard et al., 2004). Weiterhin ist in Tiam1 eine Ras-bindende Domäne (RBD) vorhanden, durch welche Tiam1 mit aktiviertem Ras direkt interagieren kann (Lambert et al., 2002; Mertens et al., 2003b). In direkter Nachbarschaft zur RBD-Domäne befindet sich noch eine „PSD-95/DlgA/ZO-1“-Domäne (PDZ), die auch *als Discs large homology region* (DHR) bezeichnet wird. Generell ist diese Domäne in mehreren Zytoskelettproteinen vorhanden, die mit Zell-Zellkontakten verbunden sind (Minard et al., 2004).

3.2.2 Regulation von Tiam1

Die Aktivität von Tiam1 wird auf verschiedene Weisen reguliert. Neben einer Änderung der Expressionshöhe ist eine Regulation grundsätzlich auch durch intramolekulare Inhibition, durch Veränderung der intrazellulären Lokalisation, durch posttranslationale Modifizierung sowie durch Interaktion mit anderen Proteinen möglich (Mertens et al., 2003b). Die spezifische Kontrolle von Tiam1 spielt insofern eine wichtige Rolle, da Rho-GTPasen zwar stark an der Entstehung maligner Tumoren beteiligt sind, allerdings bislang - im Gegensatz zum Ras-Onkogen - kaum aktivierende Mutationen in diesen Genen gefunden werden konnten. Eine fehlerhafte Regulation der Rho-GTPasen-Aktivität ist hingegen in der Lage, die Entstehung verschiedener anomaler zellulärer Phänotypen zu induzieren (Malliri und Collard, 2003; Mertens et al., 2003).

Insbesondere die Interaktion von Tiam1 mit Substraten der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) spielt eine wichtige Rolle bei der Tiam1-induzierten Rac-Aktivierung, wobei dieser Effekt vermutlich durch die Translokation von Tiam1 an die Zellmembran vermittelt wird (Fleming et al., 2004; Mertens et al., 2003; Minard et al., 2004). Tiam1 ist als zytoplasmatisches Protein generell in der Lage, Membranphospholipide bzw. Phosphoinositole an den PH-Domänen zu binden, wobei sich die Bindungsaffinitäten und auch die Effekte der PHn- und PHc-Domänen substratabhängig deutlich voneinander unterscheiden (Mertens et al., 2003). Eine Membranassoziation, die hauptsächlich durch Bindung von Phosphoinositolen an die PHn-Domäne zustande kommt, ist sowohl für die Rac-vermittelte Induktion des *membrane ruffings* als auch für die Aktivierung der JNK erforderlich (Fleming et al., 2004; Michiels et al., 1997;

Minard et al., 2004). Die Membranassoziation von Tiam1 ist auch für den Guanin-nukleotid-Austausch von Rac1 erforderlich (Fleming et al., 2004). Dies könnte daran liegen, dass dadurch die katalytische Domäne von Tiam1 in direkte Nähe mit membrangebundenen Phospholipiden gebracht wird, wodurch der Nukleotidaustausch von Rac erleichtert würde (Mertens et al., 2003). Die Bindung spezifischer Lipide an die PHc-Domäne ist durch allosterischen Umbau für die Regulation der angrenzenden katalytischen DH-Domäne und damit für die Tiam1-Aktivität verantwortlich (Crompton et al., 2000).

Ein weiterer Mechanismus der Regulation von Tiam1 stellt die Phosphorylierung dar, welche ebenfalls einen wichtigen, noch nicht in allen Einzelheiten geklärten Einfluss auf die Translokation von Tiam1 an die Zellmembran und/oder dessen Aktivierung besitzt (Mertens et al., 2003b).

Weiterhin kann Tiam1 an verschiedene zytoplasmatische und membranassoziierte Proteine binden, wodurch die Tiam1-Rac-Aktivität direkt an spezifische Signalwege gekoppelt wird (Mertens et al., 2003). Beispielsweise ist eine unmittelbare Interaktion von Tiam1 mit aktiviertem Ras durch das Vorhandensein der Ras-bindenden-Domäne (RBD) möglich. Dabei fungiert Tiam1 als Effektor, welcher die Aktivierung von Rac durch Ras direkt vermittelt. Dies erfolgt dabei hauptsächlich durch einen PI3K-unabhängigen Mechanismus (Lambert et al., 2002; Mertens et al., 2003). Auch *in vivo* konnte von Malliri et. al. (2002) die Bedeutung der Interaktion zwischen Ras und Tiam1 nachgewiesen werden, da *Tiam1-Knock-Out-Mäuse* resistent gegenüber der Entstehung Ras-induzierter Hauttumoren waren (Malliri et al., 2002). Durch die Bindung von sogenannten *Scaffold Proteinen*, wie z. B. JIP/IB2 oder Spinophilin, an Tiam1 können spezifische *downstream-Effekte* induziert werden (Mertens et al., 2003b). So fördert die Bindung von Tiam1 an JIP/IB2 die Rac-vermittelte Aktivierung der p38-MAPK-Kaskade (Buchsbaum et al., 2002). Dagegen fördert die Komplexbildung von Tiam1 mit Spinophilin die Rac-induzierte Aktivierung der p70-S6 Kinase (Buchsbaum et al., 2003). Neben einer Reihe weiterer Interaktionspartner von Tiam1 (z. B. nm23H1, c-myc, Ankyrin, CD44_{v3}), auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden soll, wird offensichtlich, dass die Aktivität von Tiam1 auf eine sehr komplexe Art und Weise reguliert wird. So könnte auch die regulierte (Über-)Expression eines Bindungspartners von Tiam1 die Effekte des Tiam1-Rac-Signalwegs bestimmen, sollte eine normale Expression von Tiam1 in der Zelle vorliegen (Mertens et al., 2003).

3.3 Funktionelle Relevanz des Tiam1/Rac-Signalwegs

Rac1 ist das am besten untersuchte Rac-Protein. Es spielt eine grundlegende Rolle in einer großen Anzahl zellulärer Prozesse, wie z. B. in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts, in der Zelltransformation, der Gentranskription oder auch der Superoxid-Produktion. Als

Hauptregulator des Aktinzytoskeletts beeinflusst Rac1 spezifisch die Lamellipodienbildung und das sogenannte *membrane ruffling* sowie die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zelladhäsion, die Zellmigration, die Tumorzellinvasion, die Metastasierung und die Zellzyklus-Progression (Baugher et al., 2005; Engers et al., 2001; Hall, 1998; Hordijk et al., 1997; Keely et al., 1997; Kuroda et al., 1998; Malliri und Collard, 2003; Olson et al., 1995; Sander et al., 1998).

So bewirkt die Aktivierung von Rac1 durch Tiam1 in einer *murinen* T-Lymphomzelllinie die Induktion von Invasion und Metastasierung (Michiels et al., 1995). Ebenso führt aktiviertes Rac1 auch zu einer gesteigerten Motilität und Invasivität in epithelialen Zellen der Mamma (Keely et al., 1997). Im Gegensatz dazu führen Tiam1 und konstitutiv aktives V12-Rac1 in epithelialen MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney) zu einer Hemmung der durch den *hepatocyte growth factor*-induzierten Zelldissoziation. In Ras-transformierten MDCK-Zellen bewirken sie einen Verlust des Invasionspotenzials in Kollagen. Ursache hierfür ist eine Aktivierung der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion (Hordijk et al., 1997). Diese zunächst gegensätzlichen Tiam1/Rac-induzierten Effekte auf die Migration und Invasion scheinen zumindest teilweise zelltyp- und zellsubstratspezifisch zu sein (Engers et al., 2001; Engers et al., 2000; Hordijk et al., 1997; Sander et al., 1998).

Rac1 ist ebenfalls an der onkogenen Transformation von Zellen beteiligt. In NIH3T3-Zellen führen V12-Rac1 sowie N-terminal *trunkiertes* Tiam1 zur onkogenen Transformation sowie zur Induktion des *membrane ruffings* (Michiels et al., 1995; van Leeuwen et al., 1995). So ist Rac1 auch wesentlich verantwortlich für die Ras- und Src-induzierte onkogene Transformation von NIH3T3-Fibroblasten (Qiu et al., 1995; Servitja et al., 2003). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen sind Mäuse, denen der Rac-spezifische Aktivator Tiam1 fehlt, resistent gegenüber der Entwicklung Ras-induzierter Hauttumore (Engers et al., 2007; Malliri et al., 2002). Am Beispiel humaner Nierenzellkarzinome konnte eine Punktmutation in der PHn-CC-Ex-Domäne von Tiam1 nachgewiesen werden, die eine Hyperaktivität des Proteins bewirkt und dadurch zur onkogenen Transformation benigner NIH3T3-Zellen führt (Engers et al., 2000).

Rac interagiert mit spezifischen Effektoren, z. B. mit der p21-aktivierten Proteinkinase (PAK), welche die Aktivierung einer Vielzahl von Signalkaskaden - zumindest teilweise zelltyp-spezifisch - koordinieren. Diese Signalwege sind in der Lage, verschiedene Transkriptionsfaktoren zu aktivieren und dadurch die Transkription bestimmter Gene zu beeinflussen (Abb. I.5). So stimulieren sowohl V12-Rac1, bei dem es sich um eine konstitutiv aktive Mutante von Rac1 handelt, als auch Tiam1 die Aktivität der JNK (Michiels et al., 1997). Weiterhin reguliert V12-Rac1 die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und bewirkt dadurch als Teil eines redox-abhängigen Signalwegs die Aktivierung von NFκB (Sulciner et al., 1996). Auch die p38-MAP-Kinase-Signalkaskade kann ebenso wie der *Serum response factor* (SRF) und die

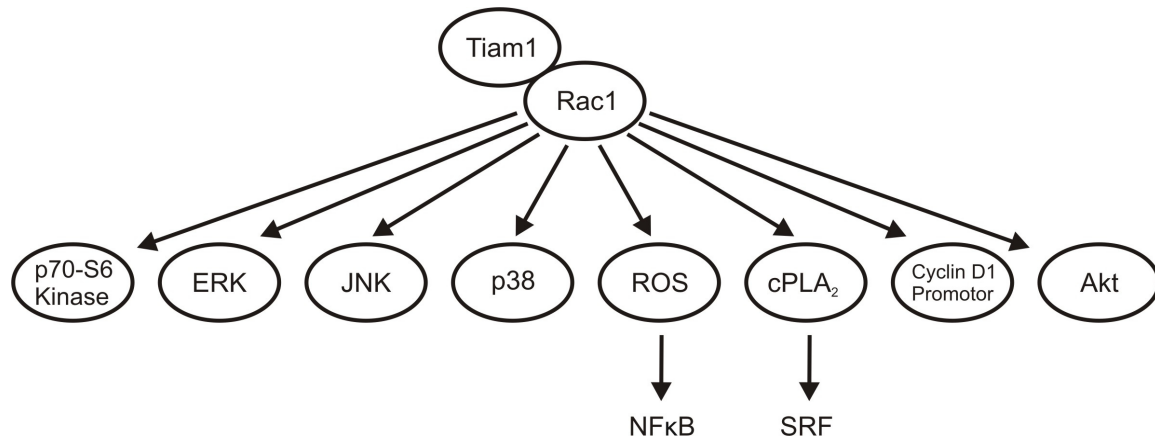


Abb. I.5 Schematische Darstellung einzelner, unabhängiger Signalwege downstream von Rac1. Die Abbildung wurde modifiziert nach Engers (2001) und Müller (2010).

Extracellular-signal Regulated Kinasen (ERK) über unterschiedliche Signalwege durch Rac1 aktiviert werden (Engers et al., 2006b; Westwick et al., 1997). Rac1 wirkt zudem in verschiedenen Zelltypen als Aktivator der p70-S6 Kinase, welche eine wichtige Rolle in der Progression von Zellen durch die G1-Phase des Zellzyklus spielt (Chou und Blenis, 1996). Weiterhin ist Rac1 an der Regulation von Cyclin D1, einem Zellzyklusprotein, das in malignen Tumoren häufig überexprimiert ist, beteiligt (Bosco et al., 2009; Fu et al., 2004; Joyce et al., 1999; Ridley, 2001). Außerdem existieren Hinweise darauf, dass Rac1 die PI3K-abhängige Aktivierung der Akt Serin/Threonin-Kinase erleichtert und dadurch zum Überleben transformierter Zellen beiträgt (Bosco et al., 2009; Rul et al., 2002; Wennerberg et al., 2002).

Im Gegensatz zu Rac1 ist über die Funktionen von Rac3 wesentlich weniger bekannt, da es erst viel später identifiziert wurde (Haataja et al., 1997). Während Rac1-defiziente Mäuse-embryonen die Embryogenese nicht überleben, überstehen dies Mäuse mit *Knockout* von Rac3 ohne offensichtliche Entwicklungsdefekte (Corbetta et al., 2005; Engers et al., 2007; Sugihara et al., 1998). Rac3 kann an viele Rac1-Effektoren binden und diese aktivieren, z. B. an PAK (Mira et al., 2000) oder die Phospholipase C β_2 (PLC β_2), wodurch die *Serum-response-factor*-vermittelte Transkription gefördert wird (Keller et al., 2005). Ebenso wird auch der JNK-Signalweg stimuliert (Haataja et al., 1997). Im Gegensatz dazu bindet Rac3 sehr schlecht an die Rac1-Effektoren *Mixed lineage kinases 2 und 3* (MLK2 bzw. MLK3) (Keller et al., 2005). Zumindest in Mammakarzinomzelllinien hat Rac3 auch keinen Einfluss auf die Aktivität von p38 oder ERK (Mira et al., 2000).

Ebenso wie Rac1 ist Rac3 an der Entstehung und Progression maligner Tumoren beteiligt. So konnten Mira et. al. (2000) endogenes, hyperaktives Rac3 in Zelllinien nachweisen, die aus stark proliferierenden humanen Mammakarzinomen sowie auch anderen Tumorgeweben

stammten. Außerdem ist das *Rac3*-Gen in der Nähe einer Region von Chromosom 17 lokalisiert (17q25.3), welche in malignen Brust- und Ovarialtumoren häufig deletiert ist und welche dadurch die *Rac3*-Expression möglicherweise deregulieren kann (Morris et al., 2000; Wennerberg und Der, 2004). In stark proliferierenden Mammakarzinom-Zelllinien ist aktives *Rac3* über einen PAK-abhängigen Signalweg für die epitheliale Zellproliferation verantwortlich (Mira et al., 2000). Bei der Analyse der subzellulären Lokalisation in diesen Zellen war auffällig, dass *Rac3* unabhängig vom Aktivierungsstatus an der Zellmembran lokalisiert ist, während endogenes *Rac1* im inaktiven GDP-gebundenen Zustand hauptsächlich im Zytosol gefunden wird. Für die gesteigerte Aktivität von *Rac3* sind dabei neben der Lokalisation an der Zellmembran auch veränderte regulatorische Faktoren, die den Guaninnukleotid-Status beeinflussen, verantwortlich. Allerdings scheint in dieser Studie von Mira et al. (2000) der *Rac3*-Aktivierungsstatus nicht mit den Tiam1-Expressionsleveln zu korrelieren.

Ähnlich wie *Rac1* besitzt auch konstitutiv aktives *Rac3* transformierende Eigenschaften. So führt *Rac3* in NIH3T3-Zellen sowohl im *Colony formation assay* als auch im *Soft agar assay* zur vollständigen onkogenen Transformation (Joyce und Cox, 2003; Keller et al., 2005). Dabei scheint die Transkription von Cyclin D1 wichtig für die Förderung des verankerungs-unabhängigen Wachstums zu sein (Keller et al., 2005).

Zudem spielt *Rac3*, ähnlich wie *Rac1*, eine wichtige Rolle in der Invasion bzw. Tumorprogression von Glioblastom- und Mammakarzinom-Zellen (Baugher et al., 2005; Chan et al., 2005). Die konstitutive Aktivierung von *Rac1* bzw. *Rac3* in metastasierenden Brustkrebszellen resultiert in einem aggressiven Phänotyp mit Lamellipodien-Bildung und führt zu einer signifikanten Steigerung der Zell-Substratadhäsion, der Migration sowie der Invasion (Baugher et al., 2005). In einer humanen Mammakarzinomzelllinie führt die spezifische siRNA-vermittelte Depletion von *Rac1* und *Rac3* zu einer starken Hemmung der Invasion, wohingegen der Effekt auf die Zellproliferation geringer ist (Chan et al., 2005). Ebenso bewirkt die Depletion von *Rac3* in Glioblastomzellen eine ausgeprägte Hemmung der Invasion, wobei dieser Effekt vergleichbar mit der *Depletion* von *Rac1* ist. Allerdings werden in diesen Zellen im Gegensatz zu *Rac1* die Migration sowie die Proliferation geringer und die Lamellipodien-Bildung gar nicht durch *Rac3* beeinflusst (Chan et al., 2005). Es bestehen in diesen Zellen also signifikante Unterschiede in der Funktion von *Rac1* und *Rac3*, welche die Organisation des Aktinzytoskeletts und die Zellmigration betreffen (Chan et al., 2005).

Die Untersuchung einer murinen Neuroblastomzelllinie ergab sogar entgegengesetzte Funktionen von *Rac1* und *Rac3* hinsichtlich der Beeinflussung der Zell-Matrixadhäsion und der Differenzierung (Hajdo-Milasinovic et al., 2007). So induzieren die Herunterregulation von *Rac1* bzw. eine *Rac3*-Überexpression die Abrundung neuronaler Zellen, während sowohl die Herunterregulation von *Rac3* als auch die Überexpression von *Rac1* zur Ausbildung

neuritenartiger Zellausstülpungen führen (Hajdo-Milasinovic et al., 2007). Dabei scheint Rac3 integrinvermittelte Zell-Matrixadhäsionen negativ zu beeinflussen. Auch die intrazelluläre Lokalisation ist in diesen Zellen verschieden. Rac1 wird hauptsächlich an der Plasmamembran gefunden, wohingegen Rac3 überwiegend in der perinukleären Region lokalisiert ist (Hajdo-Milasinovic et al., 2007).

Zusammengefasst scheint die Methodik der Untersuchungen zur funktionellen Relevanz von Rac3 eine große Rolle zu spielen. Ergebnisse, in denen keine oder nur geringe funktionelle Unterschiede zwischen Rac1 und Rac3 nachgewiesen wurden, basieren vor allem auf Studien mit konstitutiv aktiven und dominant-negativen Mutanten (Haataja et al., 1997; Hajdo-Milasinovic et al., 2007; Joyce und Cox, 2003; Keller et al., 2005; Mira et al., 2000). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Isoformen wurden dagegen bislang nur in Untersuchungen mit siRNA-vermittelter, spezifischer Depletion von Rac1 und Rac3 gefunden (Chan et al., 2005; Hajdo-Milasinovic et al., 2007). Während die Überexpression konstitutiv aktiver Mutanten von Rac1 und Rac3 in neuronalen Zellen einen ähnlichen Phänotyp induzieren, bewirken Wildtyp-(wt)-Rac1 bzw. wt-Rac3, die durch endogene GEFs aktiviert werden, außergewöhnliche phänotypische Unterschiede (Hajdo-Milasinovic et al., 2007). Diese widersprüchlichen Effekte werden dadurch erklärt, dass konstitutiv aktives Rac3 scheinbar die meisten Rac1-Effektoren aktivieren kann, da die Effektdomänen der beiden Rac-Proteine zu 100 % homolog sind und die räumliche und zeitliche Regulation der GTPasen umgangen werden (Hajdo-Milasinovic et al., 2007).

Onkogene Formen der Rac-Proteine sind konstitutiv GTP-gebunden und damit aktiv. Sie werden als attraktive Ziele in der medikamentösen Krebstherapie angesehen (Joyce und Cox, 2003). Allerdings konnten in menschlichen Tumoren - im Gegensatz zum Ras-Onkogen - bislang keine bzw. kaum aktivierende Mutationen in Genen, die für die Rho-ähnlichen GTPasen kodieren, als Ursache für eine konstitutive Aktivierung dieser GTPasen gefunden werden (Mertens et al., 2003a; Sahai und Marshall, 2002). Stattdessen scheint eher eine Überexpression oder eine Hyperaktivierung von wt-Rac3 durch vorgeschaltete Regulatoren, wie z. B. durch Tiam1, zur onkogenen Transformation von Zellen beizutragen (Joyce und Cox, 2003; Mertens et al., 2003b). Tatsächlich konnten Überexpressionen dieser Proteine in verschiedensten Tumoren nachgewiesen werden. Tiam1 ist beispielsweise nicht nur in Prostatakarzinomen überexprimiert, sondern auch in Mamma- und Kolonkarzinomen sowie Melanomen und T-Lymphomen (Engers et al., 2006a; Liu et al., 2005; Minard et al., 2004; Uhlenbrock et al., 2004). Die Expression von Rac-Proteinen ist in Mamma-, Kolon-, Prostata- und Magenkarzinomen sowie Hodentumoren und oralen Plattenepithelkarzinomen erhöht (Engers et al., 2007; Fritz et al., 1999; Kamai et al., 2004; Liu et al., 2004; Pan et al., 2004; Schnelzer et al., 2000).

4 Zielsetzung der Arbeit

Die drei verschiedenen Isoformen der Rho-ähnlichen GTPase Rac spielen ebenso wie der Rac-spezifische Aktivator Tiam1 eine wichtige Rolle in der onkogenen Transformation, in der Tumorinvasion und Metastasierung. Im Gegensatz zu Rac1 ist allerdings bislang noch sehr wenig über die funktionelle Bedeutung von Rac3 bekannt. Im Rahmen von Untersuchungen, die im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt wurden (vgl. I.2.8), konnte gezeigt werden, dass die GTPase Rac3 und ihr Aktivator Tiam1 sowohl im Prostatakarzinom als auch in der HG-PIN signifikant stärker exprimiert sind als im normalen sekretorischen Epithel und dass diese Überexpressionen zudem mit einem aggressiven klinischen Verlauf assoziiert sind (Engers et al., 2006a; Engers et al., 2007). Dabei scheinen diese Überexpressionen frühzeitig in der Entstehung des Prostatakarzinoms aufzutreten, da keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsleveln von Prostatakarzinomen und prämaligen HG-PIN-Läsionen festgestellt werden konnten. Die signifikante Korrelation der Überexpressionen von Rac3 und seinem Aktivator Tiam1 deutet darauf hin, dass neben einer gesteigerten Rac-Expression wahrscheinlich auch eine erhöhte Rac-Aktivität vorliegt (Engers et al., 2007). Aufgrund dieser Ergebnisse sowie unter Beachtung des transformierenden Potenzials von Rac3 in anderen Zelllinien (Joyce und Cox, 2003; Keller et al., 2005) könnte der Tiam1/Rac3-Signalweg daher eine wichtige Rolle in der Prostatakarzinogenese spielen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Welche funktionelle Relevanz besitzen die Rho-ähnliche GTPase Rac3 und sein Rac-spezifischer Aktivator Tiam1 für die Entstehung des Prostatakarzinoms *in vitro*?
- Besitzen Rac3 und Tiam1 onkogenes Potenzial und bewirken sie dadurch eine maligne Transformation der benignen Prostataepithelzellen?
- Werden durch Rac3 und Tiam1 verschiedene zellbiologische Funktionen in Richtung auf einen aggressiven Phänotyp verändert?

Hierzu sollten benigne prostatistische Epithelzellen, sog. BPH-1-Zellen, stabil mit leerem Vektor als Kontrolle (pLZRS-Bsd), mit Wildtyp-(wt)-Rac3, mit konstitutiv aktivem V12-Rac3, mit Volllängen-Tiam1 (FL-Tiam1) und mit konstitutiv aktivem C1199-Tiam1 transfiziert werden. Außerdem sollten die Zellen mit FL-Tiam1 und wt-Rac3 bzw. mit den beiden leeren Vektoren als Kontrolle (pLZRS-Zeo und pLZRS-Bsd) ko-transfiziert werden, um die von Engers et al. (2006a, 2007) in Prostatakarzinomen und HG-PINs beschriebene Korrelation der Überexpression von Tiam1 und Rac3 in benignen prostatistischen Epithelzellen zu imitieren.

In anschließenden funktionellen Untersuchungen sollten die Effekte auf die Proliferation, die Zell-Zelladhäsion, die Zell-Substratadhäsion, die Zellmigration und die Invasion bzw. die transformierenden Eigenschaften miteinander verglichen werden.

II. MATERIAL

1 Biologisches Material

1.1 Zelllinie

BPH-1-Zellen

Humane benigne prostatistische Epithelzelllinie (Hayward et al., 1995)

Bezugsquelle: Dr. SW. Hayward, Nashville, USA

Diese Zelllinie stammt aus dem Prostatagewebe eines 68-jährigen Mannes mit einer benignen Prostatahyperplasie (BPH), welches durch eine transurethrale Resektion gewonnen wurde. Primäre epitheliale Zellkulturen wurden mit dem *SV40 large T antigen* immortalisiert. Die Injektion bzw. Transplantation dieser Zellen in Mäuse konnte keine tumorfördernde Wirkung nachweisen. In Kultur bilden BPH-1-Zellen eine kontakthemmende Einzelzellschicht mit einer kopfsteinpflasterartigen Morphologie (Hayward et al., 1995; Sobel und Sadar, 2005; Yu et al., 2009).

1.2 Bakterienstamm

Escherichia coli DH5 α F'

Genotyp: F'end A1hsdR17_{r_k}-m_k+supE44thi-1recA1gyrArelA Δ (lacZYA-argF)
U 169 (Φ 80 Δ (lacZ)M15)

Bezugsquelle: Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA

2 Medien, Puffer und Lösungen

5 x TBE-Puffer	0,52 M Tris, 0,51 M Borsäure, 20 mM EDTA
6 x DNA-Auftragspuffer	30 % Glycerol, 0,4 % Orange G, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM EDTA
6 x SDS-Ladepuffer	60 % Glycerol, 300 mM Tris-HCl pH 6,8, 12 mM EDTA, 12 % (w/v) SDS, 864 mM β -Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
10 x SDS-Elektrophoresepuffer	0,25 M Tris, 2 M Glycin, 10 % (w/v) SDS
Agaroselösung für DNA-Gele	1-1,5 % (w/v) Agarose in 1 x TBE-Puffer

Blockierlösung	1 % (w/v) BSA, 3 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T oder 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS
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 % (v/v) H ₂ O ₂
LB-Medium, autoklaviert	20 g LB-Broth ad 1000 ml dH ₂ O, bei Bedarf nach Abkühlen Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin
LB-Agar, autoklaviert	35 g LB-Agar ad 1000 ml dH ₂ O, nach Abkühlen Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin
NP40-Lysispuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 0,5 % (v/v) NP-40
RPMI-Medium	Ad 500 ml RPMI, 5 ml 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FCS bei Bedarf Zugabe von 5 µg/ml Blasticidin und ggfs. 250 µg/ml Zeocin zur Selektion
<i>Stripping-Puffer</i>	0,2 M Glycin, 0,5 M NaCl pH 2,8
Transferpuffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 20 % (v/v) Methanol
TBS-T (Waschpuffer)	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,2 % (v/v) Tween 20
TBS	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl
Trypsin/EDTA-Lösung	10 % (v/v) Trypsin (10 x), 5 % (v/v) EDTA (1%ige-Lösung) in PBS

Rac-Aktivitätsassay:

Bakterienlysispuffer	20 % Sucrose, 10 % Glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 mM Na ₂ S ₂ O ₅ , 2 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT Vor Gebrauch frische Zugabe von: 40 µl/ml 25x Complete Protease Inhibitor
<i>GST-Fish-Puffer</i>	10 % Glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 % NP-40, 2 mM MgCl ₂ Vor Gebrauch frische Zugabe von: 40 µl/ml 25x Complete Protease Inhibitor

Soft agar assay:

1,25%ige <i>Low-Melt</i> -Agarose	2,5 g <i>Low-Melt</i> -Agarose, 200 ml H ₂ O, autoklavieren und im flüssigen Zustand für 15-30 min UV-sterilisieren
2 x RPMI-Medium (100 ml)	20 ml 10 x RPMI-Medium, 2 ml L-Glutamin, 2 ml

	Penicillin/Streptomycin, 2 ml 1,2 M NaHCO ₃ , ad 100 ml dH ₂ O (steril) → pH 7,2-7,4 mit NaOH
<i>Baselayer</i> (50 ml)	23,75 ml 2 x RPMI-Medium, 20 ml 1,25%ige <i>Low-Melt</i> -Agarose, 2,5 ml 5%iges (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 3,75 ml dH ₂ O (steril)
<i>Toplayer</i> (860 µl/well)	280 µl 2 x RPMI-Medium, 280 µl 1,25%ige <i>Low-Melt</i> -Agarose, 43 µl 5%iges (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 257 µl Zellsuspension mit 2500 Zellen in Optimum

XTT-Proliferationsassay:

XTT-Lösung	XTT 10 µg/ml in Optimum verdünnt, 25 µM PMS
------------	---

Lösungen, die in dieser Liste nicht aufgeführt sind, werden in den entsprechenden Methodenbeschreibungen erwähnt.

Die Bezugsquellen der verwendeten Reagenzien sind in Kapitel 12 aufgelistet.

3 DNA- und Protein-Standards

1 kb DNA-Leiter	Invitrogen Corporation, Paisley, UK
<i>High Range</i> Marker	BioRad Laboratories GmbH, München
<i>Low Range</i> Marker	BioRad Laboratories GmbH, München
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

4 Enzyme

Restriktionsenzyme	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot und New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Klenow-Fragment	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	QIAGEN GmbH, Hilden
HotMaster <i>Taq</i> Polymerase	Eppendorf AG, Hamburg

5 Molekularbiologische KIT-Systeme

QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
DyeEx 2.0 Spin Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

6 Oligodesoxynukleotide

6.1 PCR-Primer für Klonierungen

<i>Rac3-Primer:</i>	Rac3 L:	5'-CTTCTTCCCCGGCTTCTTCACTGG-3'
	Rac3 U:	5'-CAAGCTGGACCTCCGCGACGACAA-3'
<i>pLZRS-Primer:</i>	pLZRS MCS fwd:	5'- TGG ACC ATC CTC TAG ACT GC -3'
	pLZRS MCS rev:	5'- ACC GGC CTT ATT CCAAGC -3'

6.2 Sequenzierprimer

<i>pLZRS-Primer:</i>	pLZRS MCS fwd:	5'- TGG ACC ATC CTC TAG ACT GC -3'
	pLZRS MCS rev:	5'- ACC GGC CTT ATT CCAAGC -3'

7 Vektoren

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pLZRS-IRES (13,3 kb) ist ein retroviraler Expressionsvektor, der von Dr. J. G. Collard (Amsterdam) zur Verfügung gestellt wurde. Er wurde für stabile Transfektionen mit einem Blasticidin-Resistenzgen (pLZRS-Ires-Bsd) und für stabile Ko-Transfektionen auch mit einem Zeocin-Resistenzgen (pLZRS-Ires-Zeo) verwendet.

8 Plasmidkonstrukte und Umklonierungen

Tabelle II.1 Liste von Konstrukten, die für Transfektionen verwendet wurden

Name	Vektor	Insert	Herkunft
mock/Bsd	pLZRS-Bsd	-	Dr. J. G. Collard (Amsterdam)
wt-Rac3/Bsd	pLZRS-Bsd	Flag-wt-Rac3	Umklonierung mit SacI/Klenow und EcoRI aus Flag-wt-Rac3/pcDNA in pLZRS-Ires-Bsd (geschnitten mit Swal und EcoRI)
V12-Rac3	pLZRS-Bsd	Flag-V12-Rac3	Umklonierung mit NheI/Klenow und EcoRI aus Flag-V12-Rac3/pcDNA3.1 in pLZRS-Ires-Bsd (geschnitten mit Swal und EcoRI)
FL-Tiam1	pLZRS-Bsd	HA-FL-Tiam1	Dr. J. G. Collard (Amsterdam)
C1199-Tiam1	pLZRS-Bsd	HA-C1199-Tiam1	Dr. J. G. Collard (Amsterdam)
mock/Zeo	pLZRS-Zeo	-	Dr. J. G. Collard (Amsterdam)
wt-Rac3/Zeo	pLZRS-Zeo	Flag-wt-Rac3	Umklonierung mit SacI/Klenow und EcoRI aus Flag-wt-Rac3/pcDNA in pLZRS-Ires-Zeo (geschnitten mit Swal und EcoRI)

9 Transfizierte BPH-1-Zelllinien

Tabelle II.2 Auflistung der verwendeten transfizierten BPH-1-Zelllinien

Name	Plasmid/Vektor	Weitere Namen
mock	pLZRS-IRES-Bsd	Leerer Vektor bzw. Kontrollzellen
wt-Rac3	Flag-wt-Rac3 / pLZRS-IRES-Bsd	Wildtyp-Rac3
V12-Rac3	Flag-V12-Rac3 / pLZRS-IRES-Bsd	Konstitutiv aktives (V12-)Rac3
FL-Tiam	FL-Tiam1 / pLZRS-IRES-Bsd	Volllängen-Tiam1
C1199-Tiam	C1199-Tiam1 / pLZRS-IRES-Bsd	Stabileres und aktiveres C1199-Tiam1
mock/mock	pLZRS-IRES-Bsd / pLZRS-IRES-	Ko-transfizierte leere Vektoren bzw. ko-transfizierte Kontrollzellen
FL-Tiam/wt-Rac3	FL-Tiam1 / pLZRS-IRES-Bsd // Flag-wt-Rac3 / pLZRS-IRES-Zeo	Ko-transfiziertes FL-Tiam/wt-Rac3

10 Primärantikörper

Tabelle II.3 Auflistung der verwendeten Primärantikörper sowie Angabe der entsprechenden Verdünnungen und Blockierlösungen in Western Blots und der Immunzytochemie

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Blockierlösung
Rac (reagiert mit Rac1, Rac2 und Rac3)	BD Transduction Laboratories, USA	1:1000	1 % BSA, 3 % Milch in TBS/T
Tiam1 (C-16)	Santa Cruz, Heidelberg	1:500	1 % BSA, 3 % Milch in TBS/T
Flag-Tag (M2)	Sigma-Aldrich, Steinheim	1:400	1 % BSA, 3 % Milch in TBS/T
alpha-Tubulin	Sigma-Aldrich, Steinheim	1:3000	1 % BSA, 3 % Milch in TBS/T
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich, Steinheim	1:1000	1 % BSA in PBS

11 Sekundärantikörper

Tabelle II.4 Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Organismus, Spezifität	Hersteller
Anti-Kaninchen-HRP		Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Kaninchen IRDye 800CW	Ziege	LI-COR Biotechnology GmbH, Bad Homburg
Anti Kaninchen IRDye 680	Ziege	LI-COR Biotechnology GmbH, Bad Homburg
Anti-Maus-HRP		Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Maus IRDye 800CW	Ziege	LI-COR Biotechnology GmbH, Bad Homburg
Anti-Maus IRDye 680	Ziege	LI-COR Biotechnology GmbH, Bad Homburg

12 Verbrauchsmaterialien

<i>Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices</i>	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Deckgläser	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Eppendorfreaktionsgefäße (0,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon- <i>Tubes</i>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Fuji medical X-Ray Film (Super RX)	Fujifilm Corporation, Japan
Halbmikroküvetten UVette	Eppendorf AG, Hamburg
Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH, Dassel
Objektträger	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig

Parafilm	American National Can TM, Chicago, IL, USA
Pipettenspitzen	STARLAB GmbH, Ahrensburg
Plastikküvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Plastikpipetten	Corning Inc., New York, USA
Sterilfilter	Sartorius/vivascience AG, Hannover
<i>Transwelleinsätze, 24 well, 8 µm Poren</i>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Techno Plastic Products AG, Schweiz

13 Reagenzien

Agarose	Bio-Budget-Technologies GmbH, Krefeld
<i>Agarose Low Melt</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Aqua DeltaSelect Spüllösung	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Blasticidin S HCl	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
Bovines Serum Albumin pH 7.0	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<i>Bradford Proteinassay</i>	Bio-Rad Laboratories, München
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Dye-Terminator-Mix</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
EDTA 1 %-Lösung (Versen)	Biochrom AG, Berlin
Ethidiumbromidlösung 1 %; 10 mg/ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fibronektin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Glutathion Sepharose 4B <i>Beads</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
H ₂ O ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt

Laminin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LB-Agar	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LB-Broth	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin	Gibco BRL, Paisley, UK
Lipofectamine Reagenz	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
<i>Lumi-Light Western Blotting Substrate</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Matrigel™-Matrix, phenolrotfrei	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Milchpulver, fettarm	Bio-Rad Laboratories, München
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Nonidet-P40 (NP-40)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
N-Methylphenazonium methyl sulfate (PMS)	Fluka (BioChemika), Buchs, Schweiz
Optimem-Medium	Gibco BRL, Paisley, UK
PBS-Puffer pH 7,3	SERAG-Wiessner KG, Naila
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Paisley, UK
<i>PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Mix)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RPML-1640 Medium	Gibco BRL, Paisley, UK
RPML-1640 Medium (10 x)	Biochrom AG, Berlin
SuperFect Transfektionsreagenz	QIAGEN GmbH, Hilden
TEMED	Bio-Rad Laboratories, München
Triton X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypsin 10 x Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Merck KGaA, Hohenbrunn
X-GAL	AppliChem GmbH, Darmstadt
<i>XTT Cell Proliferation Kit</i>	Biomol GmbH, Hamburg
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt
Zeocin	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA

Standardreagenzien wurden über die Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm) und Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) bezogen.

14 Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	Systemec GmbH, Wetttenberg
Axiovert 200M	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Bakterienbrutschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Brutschrank	Forma scientific Inc., Marietta, OH, USA
Elektrophoresekammer SDS-PAGE	Hofer Inc., San Francisco, CA, USA
Elektrophoresekammer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
ELISA-Reader Model 680	Bio-Rad Laboratories, München
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Inkubationsroller RM5	CAT Zipperer GmbH, Staufen
Inkubationsschüttler 3033	GFL GmbH, Burgwedel
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Mikroskop Labovort FS	Leitz/Leica (Wetzlar)
Mikroskopkamera Leica DFC 320	Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Schweiz
Mikrowelle Micromat	AEG, Nürnberg
Neubauer Zählkammer	LO - Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
PCR-Gerät, GeneAmp PCR System 2400	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Juegesheim
pH-Meter Ø340pH/Tempmeter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Sequenzier Abi Prism 310	Applied Biosystems, Darmstadt
Spektralphotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilbank BSB4	Gelaire Flow Laboratories, Opera ,Italien
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Tischautoklav Typ 26	Melag oHG Medizintechnik, Berlin
Ultraschallgerät Sonifier	Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin
Video Copy Prozessor	Mitsubishi Electric Europe B.V., Ratingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad	GFL GmbH, Burgwedel
Western Blot Anlage	Hofer Inc, San Francisco, CA, USA
Zentrifugen: Labofuge 400R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Megafuge 1,0R	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Mikro 22R bzw. Universal 16R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

III. METHODEN

1 Molekularbiologische Methoden

1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden je nach gewünschtem Verwendungszweck bzw. gewünschter Reinheit und Menge verschiedene Kit-Systeme der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet: das *Plasmid-Maxi-Kit*, das *Plasmid-Mini-Kit* bzw. das *Spin-Miniprep-Kit*. Nach Angaben des Herstellers erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA aus einer 200, 25 bzw. 5 ml Übernachtskultur. Dazu wurden transformierte *E. coli* in LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) kultiviert, wobei dem Medium entsprechend der Antibiotikaresistenz des Plasmids Ampicillin (1:1000) hinzugefügt wurde. Das Prinzip der DNA-Isolierung beruht nach alkalischer Lyse und Reinigung der DNA auf einer Anionenaustauscherchromatographie. Nach photometrischer Bestimmung der Konzentration wurde die Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert.

1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde mit einem Spektralphotometer die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Hierzu wurde eine entsprechend verdünnte DNA-Lösung in eine Halbmikroküvette gegeben und die optische Dichte (OD_{260}) gegen eine Referenzlösung (*Blank*) gemessen. Diese entsprach dem Puffer, in dem die Nukleinsäure verdünnt oder aufgelöst wurde. Nur Werte zwischen 0,1 und 1 OD lagen im relevanten Messbereich.

Aus der Absorption der Lösung bei 260 nm ließ sich die Konzentration der Nukleinsäurelösung bestimmen, da eine relative Absorption von 1 („1 OD_{260} “) 50 µg doppelsträngiger DNA entspricht. Dabei musste die entsprechend eingesetzte Verdünnung berücksichtigt werden.

Der Quotient OD_{260}/OD_{280} gibt an, wie stark eine Nukleinsäurelösung durch Proteine verunreinigt ist, da Proteine durch Absorption der aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsmaximum von 280 nm aufweisen. Allerdings beeinflussen auch der pH- und Salzgehalt des Puffers diesen Quotienten. Ein OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis von ungefähr 1,8 entspricht einer proteinfreien DNA-Lösung.

1.3 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Detektion von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Nach Anlage von Strom wandern bei dieser Methode einzelne DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell durch ein horizontales Agarosegel in Richtung Anode, da DNA aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladen ist. Durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert und unter UV-Licht ein orange-rotes Licht emittiert, können schließlich diese DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1-2%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung wurde die Agarose in 1 x TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst und anschließend Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,0002 % hinzugefügt. Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurden diese mit 6 x DNA-Ladepuffer vermischt. Das darin enthaltene Glycerol steigerte die Dichte, so dass die Proben in die Geltaschen absanken. Um die DNA während des Auftrags und des Gellaufs besser verfolgen zu können, wurde der Farbstoff Orange G ebenfalls hinzugefügt. Um die Fragmentgröße zu bestimmen, wurde ein 1 kb Größenstandard aufgetragen. Mit 1 x TBE als Laufpuffer erfolgte die Elektrophorese bei einer Spannung von ca. 100 V. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und mithilfe eines Video Copy Processor Systems (Mitsubishi) dokumentiert.

1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur exponentiellen Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten (Mullis et al., 1986). Dazu werden eine zu vervielfältigende DNA, eine thermostabile DNA-Polymerase (z. B. *Taq*-Polymerase) in geeignetem Puffer, zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (*Primer*) und Desoxyribonukleotide benötigt. Die *Primer* sind ca. 20 bp lang und komplementär zu einer DNA-Sequenz auf je einem Strang der Doppelhelix. Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen lagern sich die beiden *Primer* (*forward und reverse*) nach Temperatursenkung an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang an (*Annealing*) und können anschließend von der *Taq*-DNA-Polymerase verlängert werden (*Elongation*). Dadurch verdoppelt sich die zwischen den *Primern* liegende DNA-Sequenz. Wird die neu synthetisierte doppelsträngige DNA danach wieder denaturiert, kann nach Binden der *Primer* eine Neusynthese stattfinden. Eine 25-45fache Wiederholung dieses Zyklus führt idealerweise zu einer exponentiellen Vervielfältigung von DNA. Die Schmelztemperatur der *Primer*

bestimmt die *Annealingtemperatur* in der PCR. Die Temperatur zur *Primerverlängerung* richtet sich nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Polymerasen. Die *Elongationszeit* hängt von der Länge des entstehenden PCR-Produktes ab, wobei die *Taq*-Polymerase ungefähr 500–1000 bp pro Minute erreicht.

In der vorliegenden Arbeit setzte sich der zu pipettierende Mastermix im Rahmen der Kolonie-PCR pro 25 µl-Ansatz, wie in Tabelle III.1 angegeben, zusammen. Auch die verwendeten PCR-Bedingungen sind aufgelistet. Als *Template* wurde Bakterien-DNA genommen (vgl. III.1.5.7). Je 8 µl des PCR-Produktes wurden anschließend mit 6 x DNA-Auftragspuffer gemischt und in einem 2%igem Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

Tabelle III.1 Mastermix und Bedingungen für das PCR-Programm bei der Kolonie-PCR

Reagenzien	Menge	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Primer fwd (10 µM)	1 µl	95	5 min	1 Zyklus
Primer rev (10 µM)	1 µl	95	30 s	35 Zyklen
10 x Puffer	2,5 µl	51–57*	30 s	
dNTPs (10 µM each)	0,5 µl	65–72*	45 s	
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	1 U	65–72*	7 min	1 Zyklus
dH ₂ O	ad 25 µl	4	Bis zur Probenentfernung	

* je nach verwendeten Primern und *Taq*-DNA-Polymerasen

1.5 Klonierung

1.5.1 Restriktionshydrolyse

Um definierte DNA-Fragmente zu isolieren, wurde die zuvor gewonnene Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (Typ II) verdaut. Dies sind Enzyme, die die DNA an genau definierten Erkennungssequenzen präzise spalten, indem sie Phosphodiesterbindungen an DNA-Doppelsträngen hydrolysieren. Die Zielsequenzen sind normalerweise palindromisch aufgebaut und bestehen aus vier bis acht Basenpaaren. Durch die Hydrolyse entstehen DNA-Fragmente mit definierten Enden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Restriktionshydrolyse nach den Angaben der Hersteller (New England Biolabs, MBI Fermentas), die zu den entsprechenden Restriktionsenzymen definierte Pufferbedingungen, Temperaturen und Inkubationszeiten vorgaben. Es wurden verschiedene Umklonierungen für folgende Konstrukte vorgenommen: Flag-wt-Rac3/pLZRS-Bsd, Flag-wt-Rac3/pLZRS-Zeo, Flag-V12-Rac3/pLZRS-Bsd. Um die Nukleotidsequenzen für

wt-Rac3 und V12-Rac3 aus dem pcDNA3.1-Vektor herauszuschneiden bzw. die Vektoren pLZRS-Bsd und pLZRS-Zeo aufzuschneiden, wurden die Restriktionsenzyme *EcoR* I, *Nhe* I, *Sac* I, und *Swa* I benutzt (vgl. Tabelle II.1). Zur Größenüberprüfung und Auftrennung der einzelnen Fragmente erfolgte schließlich eine DNA-Gelelektrophorese. Mithilfe des *PCR Purification Kits* bzw. dem *Qiaquick Gel Extraction Kit* wurden die geschnittenen Fragmente aufgereinigt.

1.5.2 Herstellung von glatten DNA-Enden

Da es nicht möglich war Restriktionsenzyme zu finden, die sowohl im DNA-Fragment als auch im Vektor nur einmal schneiden, bestand die Möglichkeit über glatte DNA-Enden (sog. *blunt ends*) zu klonieren. Hierzu wurden überhängende Enden (sog. *sticky ends*) durch das Klenow-Fragment in glatte Enden umgewandelt. Dieses Enzym, das aus der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli* besteht, besitzt dabei neben einer Exonukleaseaktivität auch eine Polymerasefunktion. Hierzu wurden einem 50 µl Restriktionsansatz mit 10 µg Plasmid-DNA 100 µM dNTPs und 10 U Klenow-Fragment zugefügt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37 °C wurde das Enzym für 10 min bei 75 °C durch Hitze inaktiviert.

1.5.3 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Damit die Religation von Vektor-DNA nach dem Restriktionsverdau möglichst verhindert wird, kann mithilfe der *Shrimp alkalischen Phosphatase* (SAP) eine Dephosphorylierung an den 5'-DNA-Enden des geschnittenen Vektorplasmids erfolgen. Das bedeutet, dass nun eine Ligation nur dann möglich ist, wenn entsprechend notwendige Phosphatreste vorhanden sind, wie z. B. beim einzufügenden DNA-Fragment. In der vorliegenden Arbeit wurden direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau zum Ansatz mit 10 µg Vektor-DNA 2 U SAP und 1/10 Volumen des entsprechenden 10 x Puffers gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung für 15 min bei 65 °C. Um die dephosphorylierte Vektor-DNA aufzureinigen, wurde das *Spin Miniprep Kit* (Qiagen) verwendet, da die DNA-Fragmente mit > 10 kb für eine Aufreinigung mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen) zu groß waren.

1.5.4 Gelelution

Nach dem Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und das Fragment mit der entsprechend gewünschten Größe mit einem Skalpell bei UV-Licht herausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Gel wurde nach Angaben des Herstellers mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) durchgeführt.

1.5.5 Ligation

Die Ligation von Insert- und Vektor-DNA erfolgte mit der T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym verbindet doppelsträngige DNA-Enden, indem es die Ausbildung von kovalenten Phosphodiesterbindungen zwischen freien gegensträngigen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden der DNA katalysiert. Bei der Ligation spielt das Verhältnis der DNA-Menge von Insert zu Vektor eine wichtige Rolle. Es wurde fünfmal mehr DNA-Fragment als Vektor verwendet, wobei folgende Formel hilfreich war:

$$\text{ng}_{(\text{Insert})} = \text{ng}_{(\text{Vektor})} \cdot \text{kb}_{(\text{Insert})} / \text{kb}_{(\text{Vektor})} \cdot \text{Verhältnis}_{\text{Insert/Vektor}}$$

Ein Ligationsansatz von 10 µl bestand aus 100-200 ng linearisierter Vektor-DNA, der entsprechend berechneten Menge an Insert, 10 x T4-Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Die Inkubation erfolgte entweder für 2-4 Stunden bei 25 °C oder über Nacht bei 16 °C.

1.5.6 Transformation

Als Transformation wird die Übertragung von DNA-Molekülen in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. Nach Lagerung bei -80 °C wurden die DH5α-Zellen auf Eis aufgetaut. Zu dem 10 µl Ligationsansatz wurden 100 µl dieser Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Durch eine anschließende kurzzeitige Erhitzung auf 42 °C über 90 s wurde die Aufnahme der DNA in die kompetenten Zellen erreicht. Nach einer kurzen Abkühlung von 2 min auf Eis wurde dem Ansatz 900 µl auf Raumtemperatur angewärmtes LB-Medium zugefügt und bei 37 °C mit 1000 rpm für 30-60 min inkubiert.

Anschließend wurden die Bakterien in einer Zentrifuge bei 5500 rpm für 2 min sedimentiert und 900 µl des Überstandes verworfen. In den restlichen 100 µl wurden die Zellen resuspendiert und auf einer LB-Agar-Platte mit Ampicillinzusatz ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht. Da die Plasmid-DNA ein Resistenzgen gegen Ampicillin enthielt, konnten sich nur die Bakterienzellen vermehren, die die DNA auch aufgenommen hatten. Alle anderen wurden durch das Antibiotikum in ihrem Wachstum gehemmt.

1.5.7 Kolonie-PCR

Mit der Kolonie-PCR ist es möglich, positive Klone nach einer Transformation zu identifizieren. Dazu werden entsprechend geeignete Oligonukleotid-*Primer* benutzt, die bei erfolgreicher Klonierung zu einer Amplifizierung einer bestimmten DNA-Sequenz führen. Die Klone der Kulturplatte dienen dabei als *Template* für die PCR. In der vorliegenden Arbeit wurden die Kolonien, die auf den LB-Amp-Agar-Platten gewachsen waren, mithilfe einer Pipettenspitze in PCR-*Tubes* gegeben. Bis zur Identifizierung positiver Klone wurden anschließend die Spitzen bei 4 °C aufbewahrt. In den PCR-Reaktionsansatz wurden

außerdem die entsprechenden *Primer*, die *Taq*-Polymerase mit Puffer und Desoxyribonukleotide gegeben (vgl.III.1.4.). Das PCR-Programm wurde auf die zu vervielfältigende Sequenz abgestimmt. Zur Erkennung der positiven Kolonien erfolgte schließlich eine Gelelektrophorese. Die Pipettenspitzen dieser Klone wurden zum Animpfen einer Bakterienkultur für eine Plasmid-Mini-Präparation in 5 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 37 °C über Nacht durchmischt.

1.5.8 Herstellung von Glycerinkulturen

Nachdem positive Klone in der Kolonie-PCR identifiziert wurden, erfolgte die erneute Transformation des entsprechenden Plasmids in kompetente *E. coli*-Zellen mit Inkubation bei 37 °C über Nacht. Die gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag in 400 µl LB-Medium mit Ampicillinzusatz resuspendiert. 200 µl dieser Suspension wurden anschließend mit der gleichen Menge Glycerin (100 %) vermischt und bei -80 °C gelagert.

1.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA zur Bestimmung einer Nukleotidsequenz beruht auf der Didesoxy- oder Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Für dieses Verfahren werden neben Desoxyribonukleotiden (dNTPs) geringe Mengen Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) verwendet, denen eine freie 3'-Hydroxylgruppe fehlt, so dass eine Polymerisationsreaktion bei Einbau eines solchen ddNTPs unterbrochen wird. Nach dem Zufallsprinzip entstehen DNA-Moleküle verschiedener Länge, die anschließend nach ihrer Größe durch die Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Da die Didesoxynukleotide fluoreszenzmarkiert sind, ist es möglich mithilfe eines Lasers von der Abfolge der Farbsignale auf die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges zu schließen.

Für die Sequenzier-PCR wird dementsprechend Plasmid-DNA zusammen mit einer Polymerase, dNTPs, ddNTPs und einem spezifischen *Sequenzierprimer* in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit sind in Tabelle III.2 aufgeführt. Zur Entfernung nicht verwendeter Nukleotide und Salze wurde die amplifizierte DNA anschließend mithilfe des *DyeEx 2.0 Spin Kits* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Mit dem Sequenzer *Abi Prism 310* (Applied Biosystems, Darmstadt) erfolgte die Auftrennung der DNA-Moleküle und die Bestimmung der entsprechenden Basensequenz.

Tabelle III.2 PCR-Ansatz und Programm für die Sequenzierung

Reagenzien	Menge	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Plasmid-DNA	200 ng	96	60 s	1 x
Primer (3,5 µM)	1 µl	96	30 s	25 x
Dye-Terminator-Mix	2 µl	50	30 s	
dH ₂ O	ad 10 µl	60	4 min	
		4	Bis zur Probenentfernung	

2 Zellbiologische Methoden

2.1 Kultivierung der benignen Prostataepithelzellen BPH-1

Die BPH-1-Zellen wurden in Zellkulturflaschen verschiedener Größe in einem CO₂-Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Das dazu standardmäßig verwendete RPMI-Medium mit allen Zusätzen (vgl. II.2) wird im Folgenden als Standardzellkulturmedium bezeichnet werden. Um einen Selektionsdruck bei den verwendeten stabil transfizierten BPH-1-Zellen zu erzeugen, wurde dem Medium das Antibiotikum Blasticidin bzw. dem Medium bei den ko-transfizierten Zellen Blasticidin und Zeocin hinzugefügt.

2.1.1 Subkultivierung

Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig im Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Kurz vor Erreichen von Konfluenz wurden sie passagiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst kurzzeitig mit PBS gewaschen. Mithilfe einer Trypsin-EDTA-Lösung wurden die BPH-1-Zellen anschließend bei 37 °C für ca. 6 min vollständig vom Zellkulturflaschenboden abgelöst, danach in frischem Medium resuspendiert und je nach Bedarf in einem Verhältnis von 1:5-1:10 verdünnt in neue Zellkulturgefäße gegeben.

2.1.2 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer), auf der ein Deckglas positioniert wurde. Die zu zählenden Zellen wurden mit einer Trypsin-EDTA-Lösung vom Zellkulturgefäßboden abgelöst und sorgfältig in neuem Medium resuspendiert. Danach wurde eine Probe dieser Zellsuspension mit Trypanblau gemischt und unter das Deckglas der Zählkammer gegeben. Mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops wurden anschließend auf mindestens vier verschiedenen großen Quadraten die Zellen gezählt und

daraus der Mittelwert gebildet. Um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu errechnen, wurde dieser Mittelwert schließlich sowohl mit dem Faktor 10^4 als auch mit dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension in Trypanblau multipliziert.

2.1.3 Kryokonservierung

Die Zellen wurden zur langfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden sie nach Ablösen vom Boden der Zellkulturflasche und nach Zentrifugation als Zellsuspension in Kryoröhrchen gegeben. Dem Medium wurde DMSO als Gefrierschutzmittel in einer 10 %igen Endkonzentration hinzugefügt. Die Kryoröhrchen wurden anfangs auf Eis, danach bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt, bevor sie in den Tank mit flüssigem Stickstoff gegeben wurden.

2.1.4 Auftauen von Zellen

Um die Zellen nach dem Einfrieren wieder zu rekultivieren, wurden sie zunächst im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. In einem *Falcon-Tube* wurden sie danach mit frischem Medium vermischt und für 5 min bei 500 g zentrifugiert, um das toxische DMSO zu beseitigen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in neuem Zellkulturmedium resuspendiert. Nach Überführung in eine Zellkulturflasche wurden die Zellen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, einem CO_2 -Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. In den Tagen darauf erfolgte ein Mediumwechsel, um tote Zellen und verbliebendes DMSO zu entfernen.

2.2 Stabile Transfektion

Die Transfektion ermöglicht es, Fremd-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen. Durch die genetische Information der eingeschleusten DNA sind die Zellen in der Lage, ein gewünschtes Protein zu exprimieren. Bei stabil transfizierten Zellen wurde die transfizierte DNA dauerhaft in das Genom der Wirtszelle eingebaut. So bleibt sie auch nach mehreren Zellteilungen erhalten. Als Selektionsmarker dient meistens ein Antibiotika-Resistenzgen in dem Vektorsystem, in dem die zu transfizierende DNA eingebaut ist. Es wurde der retrovirale Vektor pLZRS-Ires verwendet, der entweder ein Blasticidin- (pLZRS-Bsd) oder Zeocin-Resistenzgen (pLZRS-Zeo) als Selektionsmarker enthielt und in den jeweils zuvor die zu untersuchende cDNA kloniert wurde.

2.2.1 X-Gal-Färbung zur Optimierung der Transfektionseffizienz

Um die besten Bedingungen für die Transfektion von BPH-1-Zellen, von denen bekannt ist, dass sie nur relativ schwer transfizierbar sind, zu ermitteln, erfolgte eine Analyse der Transfektionseffizienz mithilfe der X-Gal-Färbung. Dazu wurden die Zellen entweder mit

Lipofectamine™ (Invitrogen), SuperFect (Qiagen) oder FuGENE 6 (Roche) transfiziert. Zur Optimierung erfolgte dies jeweils nach Herstellerangaben in mehreren Verdünnungen des Transfektionsreagenzes mit verschiedenen Mengen an Vektor-DNA und unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Es handelt sich bei der X-Gal-Färbung um eine zytochemische Färbung. Die Zellen werden mit einem β -Galactosidase codierenden Vektor (β -Gal in pCMV) transfiziert. Dieses Enzym spaltet das Substrat X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid), wodurch letztendlich in den transfizierten Zellen ein blauer Farbstoff entsteht und diese anfärbt.

Zur Ermittlung einer optimalen Transfektionseffizienz mithilfe von Standardtransfektionsreagenzien wurden die BPH-1-Zellen in 24- bzw. 12-well-Platten ausgesät. Nach der Transfektion mit β -Gal in pCMV mit den verschiedenen Transfektionsbedingungen und -reagenzien erfolgte die Färbung mit X-Gal. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 2 min in 3,7%igem Formaldehyd (in PBS) fixiert. Nach zweifachem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe der X-Gal-Färbelösung. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Durch Vergleich der bläulichen Färbung transfizierter Zellen mit ungefärbten, untransfizierten Zellen ließ sich die Transfektionseffizienz bei den jeweils ausgewählten Bedingungen ermitteln. Zwar konnte auch mit Lipofectamine™ eine geringe Transfektionsrate nachgewiesen werden, allerdings waren die Transfektionen mit SuperFect und insbesondere mit FuGENE 6 erfolgreicher. Da auch die Vitalität der Zellen durch Lipofectamine™ und SuperFect im Vergleich zu FuGENE 6 relativ stark herabgesetzt wurde, wurde letztendlich FuGENE 6 als Transfektionsreagenz zur stabilen Transfektion der BPH-1-Zellen eingesetzt. Dabei stellte sich ein Verhältnis von 1:6 zwischen Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz als optimal heraus.

2.2.2 Stabile Transfektion mit FuGENE 6

Die ursprüngliche BPH-1-Zelllinie wurde bei einer möglichst niedrigen Anzahl von Passagen transfiziert. Am ersten Tag wurden 80 000 BPH-1-Zellen in Medium in einem 12-well (3,8 cm²) ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Angaben des Herstellers erfolgte am zweiten Tag die Transfektion mit FuGENE 6. Es wurde nur DNA eingesetzt, die entweder mit dem *Plasmid-Maxi*- oder *Plasmid-Mini-Kit* (Qiagen) gewonnen wurde. Hierzu wurde in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß serumfreies Optimem-Medium gegeben und 3 μ l FuGENE 6-Transfektionsreagenz hineinpipettiert. Nach *Vortexen* für 1 s und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde schließlich 0,5 μ g Plasmid-DNA in einem Verhältnis von 1:6 zum Transfektionsreagenz hinzugefügt. Das Endvolumen sollte insgesamt ca. 50 μ l betragen. Für weitere 15–45 min wurde der Komplex bei Raumtemperatur inkubiert und danach

tropfenweise auf die Zellen im 12-well gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen im CO₂-Inkubator. Am fünften Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Medium, das Selektionsantibiotikum enthielt, versetzt (Tabelle III.3). Es erfolgte ein regelmäßiger Mediumwechsel, um tote Zellen zu entfernen und frisches Antibiotikum zuzuführen. Das Wachstum der Zellen wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop verfolgt. Nach Bildung verschiedener Zellkolonien innerhalb einer Vertiefung der 12-well-Platte wurden die Zellen trypsinisiert und in ein größeres Zellkulturgefäß überführt. Diese dadurch erhaltenen *Zellpools* wurden weiterhin in Selektionsmedium kultiviert und in immer größeren Zellkulturflaschen angereichert. Sobald ausreichend Zellen eines *Pools* vorhanden waren, wurde ein Teil zur Konservierung eingefroren (vgl. III.2.1.3).

Tabelle III.3 Stabil transfizierte Plasmide und verwendete Selektionsbedingungen

Zelllinie	Name	Stabil transfiziertes Plasmid	Selektionsbedingungen
BPH-1	mock	pLZRS-Bsd	5 µg/ml Blastizidin
	wt-Rac3	wt-Rac3/pLZRS-Bsd	
	V12-Rac3	V12-Rac3/pLZRS-Bsd	
	FL-Tiam	FL-Tiam1/pLZRS-Bsd	
	C1199-Tiam	C1199-Tiam1/pLZRS-Bsd	
BPH-1	mock/mock	pLZRS-Bsd / pLZRS-Zeo	5 µg/ml Blastizidin,
	FL-Tiam/wt-Rac3	FL-Tiam1/pLZRS-Bsd / wt-Rac3/pLZRS-Zeo	250 µg/ml Zeocin

2.3 Herstellung totaler Zelllysate

In der Regel wurden die kultivierten Zellen mit dem NP40-Lysispuffer und anschließendem Ultraschallaufschluss lysiert. Hierfür wurden die Zellen in 10 cm-Durchmesser Schalen zunächst bis zum Erreichen einer ca. 90%igen Konfluenz kultiviert. Nach Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Zugabe von ca. 400 µl NP40-Lysispuffer, der mit einem Proteinase-Inhibitor-Mix (25 x, Roche) versetzt war, für 20 bis 30 min bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen von der Kulturschale abgeschabt und in ein 1,5 ml Eppendorf *Tube* gegeben. Nach anschließendem Ultraschallaufschluss wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C mit 14 000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues *Tube* überführt. So wurden unlösliche Zellbestandteile entfernt. Mithilfe der Bradford-Messung (vgl. III.3.1) wurde die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt und gegebenenfalls wurden die Proben auf gleiche Konzentrationen angeglichen. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Proben schließlich mit 6 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 5 min denaturiert.

2.4 Immunozytochemie

Die Immunozytochemie wurde eingesetzt, um die Lokalisation von Proteinen innerhalb der BPH-1-Zellen zu überprüfen. Hierfür wurden die zu untersuchenden stabil transfizierten Zellen auf sterile Deckgläschen in 6-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und in der Regel einen Tag in Standardzellkulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS mit 3,7%igem Formaldehyd (in PBS) 30 min bei Raumtemperatur fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Formaldehyd bildete Quervernetzungen zwischen Aminogruppen, wodurch ein Netzwerk von Proteinen entstand, in dem die Zellarchitektur erhalten blieb. Nach Absaugen des Formalins wurden die auf den Deckgläsern gewachsenen Zellen zweimal erneut mit PBS gewaschen und anschließend für 3 min in 0,5 % Triton-X-100 (in PBS) inkubiert, um die Zellen zu permeabilisieren. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte eine 30-minütige Inkubation in einer Blockierlösung (1 % BSA in PBS), wodurch unspezifische Bindungsstellen gesättigt wurden. Alle weiteren Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Danach wurden die Zellen für eine Stunde mit TRITC-markiertem Phalloidin (1:1 000) inkubiert, um die Lokalisation des Aktinzytoskelettes sichtbar zu machen. Mit einem kleinen Tropfen Mowiol-Lösung wurden die Deckgläser auf Objektträgern eingebettet, über Nacht getrocknet und schließlich in der konfokalen Laser-Scanning-Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

3 Biochemische Methoden

3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration von totalen Zelllysaten mit der Methode nach Bradford. Hierfür wurde die Bradford-Lösung der Firma BioRad verwendet. Diese Methode basiert auf einer Farbreaktion durch Komplexbildung der basischen Aminosäuren in der Proteinlösung mit dem Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G250* in Phosphorsäure (Compton und Jones, 1985), durch die sich das Absorptionsmaximum von Coomassie von 465 nm auf 595 nm verschiebt (Rehm und Letzel, 2006). Aus der Zunahme der Extinktion bei 595 nm und einer Eichgeraden mit BSA kann schließlich die Proteinkonzentration errechnet werden. Zur Proteinbestimmung der Proben wurden 798 µl H₂O und 2 µl Proteinlösung in Plastikküvetten pipettiert und mit 200 µl Bradford-Lösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm in einer Doppelbestimmung gemessen. Mithilfe einer Eichgeraden, die aus verschiedenen Mengen an Rinderserumalbumin (BSA 20 µg, 10 µg, 5 µg) erstellt wurde, erfolgte die Ermittlung der Proteinkonzentration. Allerdings wurden

nur Extinktionswerte im linearen Bereich zwischen 0,2 und 0,8 beachtet. Der Puffer, in dem die Proteine gelöst waren, wurde als Kontrolle benutzt.

3.2 Probenvorbereitung

Um vergleichbare Proteinmengen auf Polyacrylamidgele auftragen zu können, wurden die Proben zunächst mithilfe des Lysispuffers auf vergleichbare Proteinkonzentrationen verdünnt und mit Ladepuffer versetzt. Hierfür wurde ein 6x SDS-Ladepuffer verwendet, der denaturierende Substanzen enthielt, die die räumliche Struktur der Proteine zerstören. Das enthaltene β -Mercaptoethanol führte zu einer reduktiven Spaltung der Disulfidbrücken in den Polypeptidketten, wohingegen sich das anionische SDS (Sodiumdodecylsulfat) an die Proteine anlagerte, inter- bzw. intramolekulare Wechselwirkungen aufhob und die Proteine somit linearisierte. Die stark negative Ladung des SDS überdeckte außerdem die Eigenladung der Proteine, wodurch negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs/Masse-Verhältnis entstanden, die im elektrischen Feld nur aufgrund der Größe der Proteine wanderten (Rehm und Letzel, 2006). Durch anschließende Erhitzung der Proben auf 95 °C für 5 min wurden die Proteine durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen weiter denaturiert. Solche denaturierten Proteinproben wurden entweder direkt auf das Gel aufgetragen oder bei -20 °C gelagert.

3.3 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein von Laemmli entwickeltes Verfahren, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen (Laemmli, 1970). In der vorliegenden Arbeit wurden diskontinuierliche Elektrophoresen in vertikalen Gelelektrophorese-Apparaturen von Hoefer in einem SDS-haltigen Tris-HCl/Glycin-Puffersystem durchgeführt. Die Proben mussten hierbei erst ein sogenanntes Sammelgel durchlaufen, in dem sie zu einer schmalen Bande zusammengestaucht wurden, bevor sie im Trenngel aufgetrennt wurden. Hierfür wurden Gele aus Polyacrylamid verwendet. Diese Substanz entsteht in einer radikalischen Kettenreaktion durch Polymerisation von Acrylamidmonomeren und Bisacrylamid, welches zu Quervernetzungen führt. Diese Reaktion wird durch Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalbildner und TEMED als Katalysator initiiert. Die Porengröße des Gels bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld, wobei kleinere Moleküle schneller als größere wandern. Sie lässt sich durch den Acrylamidgehalt des Gels variieren. Es wurden 8-12%ige Trenngele je nach Größe des zu detektierenden Proteins verwendet. In Tabelle III.4 sind die Zusammensetzungen der Trenn- und Sammelgele dargestellt. Nach der entsprechenden Probenvorbereitung und Auftragung

der Proben mit möglichst gleichen Proteinmengen wurden die Proteine bei konstanter Spannung von 200 V der Größe nach aufgetrennt. Als Größenstandard dienten entweder der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* (MBI Fermentas) oder der *Low bzw. High Range Marker* (BioRad).

Tabelle III.4 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele

SDS-Trenngel	8 %	10 %	12%	SDS-Sammelgel	10 ml
dH ₂ O	4,7 ml	4,0 ml	3,3 ml	dH ₂ O	6,8 ml
Acrylamid 30 %	2,6 ml	3,3 ml	4,0 ml	Acrylamid 30 %	1,7 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	1,0 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	TEMED	10 µl

3.4 Western Blot

Unter Western-Blotting wird der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran verstanden. In dieser Arbeit erfolgte der Proteintransfer mittels *Wet-Blotting*-Verfahren auf Nitrocellulose-Membranen. Zunächst wurden die Membran und vier *Whatman* Filterpapiere entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten und genauso wie das Gel in Transferpuffer getränkt. Nach dem „Sandwichprinzip“ wurden schließlich die Membran und das Gel zwischen je zwei Filterpapiere gelegt und zwischen zwei in Transferpuffer eingelegte Schwammtücher in eine Gitterkassette geklemmt. Luftblasen wurden mit einer Plastikpipette beseitigt. Die Kassette wurde anschließend in den Tank mit Transferpuffer eingesetzt, wobei passend zur Wanderung der Proteine im elektrischen Feld darauf zu achten war, dass sich die Membran näher an der Anode befand als das Gel. Unter ständiger Kühlung erfolgte der Proteintransfer entweder bei 40 V über Nacht oder bei 90 V in 90 Minuten. Mithilfe der Ponceau-Rot-Färbung der Membran wurde der erfolgte Proteintransfer kontrolliert.

3.5 Immunologische Proteindetektion mithilfe der Chemilumineszenz

Nachdem die Proteine mithilfe des Western-Blottings auf die Nitrocellulosemembran transferiert wurden, erfolgte mit der Antikörperdetektion der Nachweis spezifischer Proteine (Immunoblot). Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran entweder über Nacht bei 4 °C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation der Membran in dem mit Blockierlösung verdünnten spezifischen Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über

Nacht bei 4 °C durchgeführt (vgl. Tabelle II.3). Nach dreimaligem Waschen mit TBS/T für je 10 min wurde die Membran mit einem Meerrettich-Peroxidase-(HRP, *Horseradish-Peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet war, für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auch nach diesem Schritt wurde die Membran erneut dreimal in TBS/T gewaschen. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte mithilfe der Chemilumineszenz, wobei das *Lumi-Light Western Blotting Substrate* (Roche) und eine selbst angesetzte ECL-Lösung, deren Zusammensetzung im Materialteil beschrieben ist (vgl. II.2), verwendet wurden. Nach Vermischen der einzelnen Komponenten wurde die Lösung auf die Membran gegeben und für 5 min inkubiert. In einer Filmkassette wurde ein lichtempfindlicher Röntgenfilm auf die Membran gelegt. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase katalysierte die Reaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid, wobei unter schwach alkalischen Bedingungen Energie in Form von Licht frei wurde. Das emittierte Licht belichtete den Röntgenfilm, wodurch nach Entwicklung und Fixierung der Filme in der Dunkelkammer eine Schwärzung entstand.

3.6 Proteindetektion mithilfe des Odyssey Infrared Imaging Systems

Eine alternative und viel neuere Methode zur Detektion der Antikörperbindung durch die Chemilumineszenz (vgl. III.3.5) stellt die Proteindetektion mithilfe des *LI-COR Odyssey Infrared Imaging Systems* dar (Mathews et al., 2009). Hierbei wird eine mit Antikörpern inkubierte Nitrocellulose-Membran von einem Infrarot-Scanner abgelesen, der dabei Fluoreszenzen mit einer Wellenlänge von 680 nm bzw. 800 nm erkennt und diese schließlich auf einem Computerbildschirm wiedergibt. Die Antikörperinkubation wurde ähnlich wie in der zuvor beschriebenen Methode durchgeführt. Da bestimmte Substanzen allerdings eine starke Hintergrundfärbung erzeugen, wurde – wie vom Gerätehersteller empfohlen – auf den Zusatz von Tween 20 in der Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBS) sowie auf eine Färbung der Membran mit Ponceau-Rot verzichtet. So erfolgte ebenfalls auch der allerletzte Waschschriff der Membran vor dem *Scan* mit TBS ohne Tween 20-Zusatz, während ansonsten TBS/T als Waschpuffer und als Lösung, in der die Antikörper verdünnt wurden, verwendet wurde. Während die Primärantikörper im Vergleich zur herkömmlichen Methode unverändert blieben, wurden für die Odyssey-Detektion spezielle mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Sekundärantikörper meist in einer Verdünnung von 1:10 000 genutzt. Mithilfe eines speziellen laser-gestützten Detektionssystems wurde der an den primären Antikörper gebundene sekundäre Antikörper schließlich detektiert und mithilfe einer Software bearbeitet. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die hohe Sensitivität, durch die auch sehr schwache Signale gut dargestellt werden konnten.

3.7 Entfernen von Antikörpern von einer Membran

Um Nitrocellulose-Membranen für verschiedene Antikörperdetektionen verwenden zu können, wurden durch *Stripping* die gebundenen Antikörper entfernt. Hierzu wurde die Membran nach Waschen mit TBS/T für 5 min in *Stripping*-Puffer geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit Wasser angespritzt und stand nun für eine neue Antikörperinkubation zur Verfügung.

3.8 Rac-Aktivitätsassay

Um die Aktivität von Rac in Zelllysaten aus Rac3- und Tiam1-transfizierten BPH-1-Zellen zu untersuchen, wurde ein *Rac-Aktivitätsassay* durchgeführt. Grundlage dieses Versuchs ist, dass GTPase-bindende Domänen von Effektormolekülen mit einer starken Affinität an entsprechende aktive GTPasen binden. Der *Rac-Aktivitätsassay* nutzt dabei die p21-aktivierte Proteinkinase (PAK) als *downstream*-Effektor von Rac, um aktive GTP-gebundene Rac-Formen aus den Zelllysaten zu isolieren. Die Bestimmung der Rac-Aktivität erfolgte hierbei im Wesentlichen wie von Sander et al. (1998) beschrieben. Als Fusionsprotein wurde Glutathion-S-Transferase (GST)-PAK-CD (PAK-CRIB Domain) verwendet, welches die Rac- und Cdc42-bindende Region von humanem PAK1B enthielt. Zur Herstellung dieses Fusionsproteins wurden Zellen des *E. coli*-Stamms BL21 mit dem Konstrukt GST-PAK-CD transformiert (Sander et al., 1998) und bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 vermehrt. Durch Zugabe von 0,1 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) wurde die Expression des rekombinanten Proteins für 2 Stunden bei 37 °C im Schüttelinkubator induziert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugieren für 10 Minuten mit 4000 g bei 4 °C pelletiert, in 10 ml eines speziellen Bakterienlysispuffers resuspendiert und für 2 Minuten bei 50 % sonifiziert. Danach wurden die Lysate bei 4000 g und 4 °C für mindestens 45 min erneut zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden 500 µl Glutathion-gekoppelte Sepharose-4B-Beads den Bakterienüberständen hinzugefügt und sie wurden für 30 min bei 4 °C rotierend inkubiert. Nachfolgend wurde das an die *Beads* gebundene Protein dreimal mit Bakterienlysispuffer gewaschen und die *Beads* wurden mit 500 µl *GST-Fish-Puffer* zu einer 50%igen Suspension resuspendiert.

Die zu analysierenden Zelllinien wurden in 10 cm-Durchmesser Zellkulturschalen ausgesät und nach Erreichen einer ca. 80%igen Konfluenz zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen sowie anschließend mit 200-300 µl *GST-Fish-Puffer* für 5 min auf Eis lysiert. Danach wurden die Lysate für 5 min bei 4 °C und 13 000 g abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue 1,5 ml Eppendorf-*Tubes* überführt und es erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford mit Angleichung der Proteinkonzentrationen. Hiervon wurden Aliquots entnommen, um später die

Rac-Expression (Rac-gesamt) im Western Blot zu detektieren. Zu 700 µg Protein wurden anschließend 140 µl der 50%igen Suspension, die die rekombinanten, an Glutathion-Sepharose-*Beads* gebundenen GST-PAK-CD-Fusionsproteine enthielt, gegeben und bei 4 °C für 1–2 Stunden rotierend inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die *Beads* bei 3 000 g und 4 °C für 30 s abzentrifugiert, dann dreifach mit einem Überschuss an *GST-Fish-Puffer* gewaschen und mithilfe von Kapillarspitzen wurde der restliche Puffer wieder abgesaugt. Anschließend wurden die gebundenen *Beads* in 140 ml 2 x SDS-Proben-Puffer resuspendiert. Durch Erhitzen der Proben bei 95 °C für 5 min lösten sich die *Beads* von den Proteinen. Nach erneutem Zentrifugieren für 1,5 min bei 3 000 g wurden die Überstände in ein neues 1,5 ml Eppendorf-*Tube* überführt und bei -20 °C eingefroren. Auch den Aliquots zum Nachweis der gesamten Rac-Expression wurde SDS-Proben-Puffer hinzugefügt, ebenso wurden sie bei 95 °C für 5 min erhitzt und anschließend weggefroren. Nachfolgend wurden von den zwei verschiedenen Probenarten zum Nachweis sowohl der totalen Rac-Expression (Rac-gesamt) als auch der aktiven Rac-Proteine Western Blots mithilfe eines monoklonalen Rac1-Antikörpers, der aber auch Rac2 und Rac3 erkennt, durchgeführt.

4 Funktionelle Untersuchungen

4.1 Proliferationsassays

4.1.1 XTT-Proliferationsassay

Es handelt sich beim *XTT-Proliferationsassay* um einen Test, der die Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen untersucht. Dieser Test beruht auf der Fähigkeit metabolisch aktiver Zellen das Tetrazoliumsalz XTT (sodium 3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate) zu einem orange gefärbten Formazansalz zu reduzieren (Scudiero et al., 1988). Da der gebildete Farbstoff wasserlöslich ist, diffundiert er passiv in das umgebende Medium (Roehm et al., 1991; Scudiero et al., 1988). Die Farbintensität kann anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt werden. Dabei verhält sich die gemessene Absorption proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Dieser Test findet zunehmend Bedeutung in der Quantifizierung von Zellen, da er bei fehlender Toxizität und hoher Sensitivität relativ einfach und genau durchführbar ist.

Für diesen Test wurden auf sieben verschiedenen 96-well-Mikrotiterplatten in sechs Vertiefungen pro Zelllinie jeweils 3500 BPH-1-Zellen in 100 µl Standardzellkulturmedium

ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Eine Spalte der Testplatten wurde nur mit Medium gefüllt. Vier Stunden nach Aussaat (Tag 0) sowie in den folgenden sechs Tagen wurde der XTT-Test zur gleichen Zeit durchgeführt. Dafür wurden zunächst Aliquots der XTT- und PMS(N-Methylphenazonium methyl sulfate)-Stocklösungen kurz vor Gebrauch bei 37 °C aufgetaut und nach Angaben des Herstellers zur XTT/PMS-Reagenz vermischt. PMS diente dabei als Aktivierungsreagenz. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 50 µl dieser Lösung in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, sodass ein Farbumschlag von gelb nach orange erfolgte. Nach Ablauf dieser Einwirkungszeit erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 655 nm mithilfe eines *ELISA-Readers*. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Statistikprogramms SPSS 14.0.

4.1.2 Wachstumskurven nach Zellzählung

Eine weitere, jedoch sehr aufwendige Möglichkeit, die Zellproliferation zu bestimmen, ist die Zellzählung. Hierzu wurden pro Zelllinie je 300 000 Zellen in sieben T30-Zellkulturflaschen ausgesät. In den folgenden sieben Tagen wurden für jede Zelllinie einzeln die Zellen einer Zellkulturflasche trypsiniert, anschließend gezählt und ein Mittelwert gebildet.

4.2 Adhäsionsassays

4.2.1 Beurteilung der Zell-Zelladhäsion und der Zellmorphologie

Um die Zell-Zelladhäsion der stabil transfizierten BPH-Zelllinien zu untersuchen, wurden Einzelzellsuspensionen in Standardzellkulturmedium in Zellkulturflaschen ausgesät. Anschließend wurden mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie sowohl die Zell-Zelladhäsion als auch die Zellmorphologie im Verlauf beurteilt und durch Fotos mit der Mikroskopkamera (Leica DFC 320) dokumentiert.

4.2.2 Bestimmung der Zell-Substratadhäsion

Die Untersuchung der Adhäsion von stabil transfizierten BPH-Zellen an das Basalmembranprotein Laminin, einem wichtigen Substrat der extrazellulären Matrix, erfolgte im Wesentlichen wie bei Engers et al. (1999) beschrieben.

Hierzu wurden zunächst 3,5 cm-Durchmesser große Petrischalen mit Laminin (1 µg Protein in PBS/cm²; Sigma) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, erfolgte nach Abpipettieren der Proteinlösung eine erneute Inkubation im Kühlschrank mit einer 3%igen BSA-Lösung in PBS. Am nächsten Tag wurde auch hier die nicht gebundene Substanz entfernt und die beschichteten Petrischalen wurden für eine halbe

Stunde in Standardzellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablösen der Zellen und Zellzählung wurde eine Suspension von 10 000 Zellen in 2 ml Medium auf die Schalen gegeben und gleichmäßig verteilt. Für 30 min wurde sie in den Brutschrank gestellt. Diese Zeit wurde gewählt, da in einem Vorversuch gezeigt werden konnte, dass bei kürzeren Inkubationszeiten kaum Zellen adhären wurden und dadurch keine Unterschiede zwischen den Zelllinien nachweisbar waren. Nach Entfernen der Zellsuspension wurden die Petrischalen anschließend vorsichtig zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. In vier vormarkierten gleichgroßen Zählfeldern wurde die Anzahl der adhären gewordenen Zellen pro Schale am Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Für jede Zelllinie erfolgte der Versuch in einem Dreifachansatz und wurde insgesamt mindestens dreimal wiederholt. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse mit einem festgelegten Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde im nichtparametrischen Mann-Whitney-Test mithilfe von SPSS 14.0 überprüft.

4.3 Migrationsassays

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Versuche zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit von BPH-1-Zellen angewendet, die stabil mit verschiedenen Tiam1- bzw. Rac3-Konstrukten transfiziert waren. Der *Transwell-Migrationsassay* wurde mit allen Zelllinien durchgeführt, der *Scratchassay* dagegen nur mit den Rac3- bzw. mock-transfizierten Zelllinien.

4.3.1 Transwell-Migrationsassay

Das *in vitro* Migrationsverhalten der stabil transfizierten BPH-1-Zellen wurde mithilfe des *Transwell-Migrationsassays* untersucht, indem suspendierte Zellen aktiv durch *Transwell-Membranen*, die mit Fibronektin beschichtet wurden, migrieren mussten. Hierzu wurden sogenannte *Transwelleinsätze* für 24-well-Platten (Greiner Bio-One) verwendet, deren Membranen Poren von 8 µm Durchmesser aufwiesen. Zunächst wurden beide Seiten der Membranen mit Fibronektin in PBS (10 µg/ml) beschichtet (5 µg/cm²) und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Lösung und Spülen der *Transwells* mit sterilem Wasser wurde 0,5 ml konditioniertes Medium in die unteren Kammern gegeben. Dieses bestand aus zellfreiem OptiMem-Medium, das sich zuvor 24 Stunden auf nahezu konfluenten Cos-7-Zellen (J. G. Collard, Amsterdam, Niederlande) befand. Nach Zellzählung wurden als Einzelzellsuspension 50 000 Zellen in 150 µl serumfreiem OptiMem-Medium in die obere Kammer eines *Transwells* gegeben und für 2-3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen von der oberen Kammer aktiv durch die Poren an die Unterseite der Membran wandern. Im Anschluss daran erfolgte die Fixierung und

Anfärbung der Zellen an der *Transwellmembran*. Hierzu wurden die Einsätze aus den *well*-Platten herausgenommen und die Membranen vorsichtig mit einem Wattestäbchen von innen gereinigt, um alle nicht migrierten Zellen zu entfernen. Für 5 min wurden die Zellen in -20°C kaltem Methanol fixiert, erneut gereinigt und schließlich mit Hämalaun und Eosin gefärbt. Die Membranen wurden aus den Einsätzen herausgeschnitten, in Xylol gespült und mit den Zellen nach oben auf einen Objektträger gelegt. Mithilfe von Eukitt wurde schließlich ein Deckglas luftblasenfrei auf den Membranen befestigt. Am Lichtmikroskop wurden die migrierten Zellen gezählt. Die unterschiedlichen Zelllinien wurden pro Versuch in einem Sechsfachansatz getestet und jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt. Auch hier erfolgte die statistische Auswertung der Ergebnisse mit dem SPSS-Programm, wobei der nichtparametrische Mann-Whitney-Test verwendet wurde und das Signifikanzniveau mit $p < 0,05$ festgelegt wurde.

4.3.2 Scratch assay

Im sogenannten *Scratch assay* wird die Fähigkeit von Zellen bestimmt, einen künstlich gesetzten Defekt durch aktive Migration zu schließen.

Für diesen Versuch wurden im Doppelansatz 150 000 bzw. 300 000 BPH-Zellen pro Zelllinie in einem 6-*well* in Standardzellkulturmedium ausgesät und bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Bei Erreichen eines konfluenten *Monolayers* wurden pro Vertiefung mithilfe einer 1000 µl-Pipettenspitze drei parallele „Kratzer“ (engl. „*scratch*“) durch die geschlossene Zellschicht gezogen. Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 3 ml serumfreiem OptiMem-Medium. Im Brutschrank wurden die Zellen weiter inkubiert. Die Breite der künstlich gesetzten Defekte wurde sowohl direkt zu Beginn als auch in den beiden folgenden Tagen ausgemessen und fotografiert. Damit nach unterschiedlichen Zeiten auch dieselben Stellen vermessen wurden, wurden zu Beginn des Versuchs mit einem Stift drei parallele Striche auf dem äußeren Plastikboden gezogen, die senkrecht zu den künstlich gesetzten Defekten verliefen. Knapp über den entsprechenden Schnittpunkten dieser Linien wurde die Breite des Defekts phasenkontrastmikroskopisch unter Verwendung eines Messokulars bestimmt. Für jede Zelllinie wurden je zehn Werte an entsprechenden Stellen im Verlauf ermittelt. Insgesamt wurden die Versuche dreimal wiederholt. Mithilfe des Programms SPSS 14.0 erfolgte schließlich die statistische Auswertung der Ergebnisse mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

4.4 Matrigel-Invasionsassay

Mithilfe des *Matrigel-Invasionsassays* wurde das *in-vitro*-Invasionsverhalten der transfizierten BPH-1-Zellen untersucht. Dabei müssen die suspendierten Zellen aktiv eine rekonstituierte

Basalmembran (Matrigel) in einem aufeinanderfolgenden Prozess, der die proteolytische Degradation des Substrats sowie eine aktive Migration der Zellen umfasst, durchdringen. Die Durchführung dieses Versuchs erfolgte im Wesentlichen wie bei Engers et al. (1999) beschrieben.

Hierzu wurden *Transwelleinsätze* für 24-well-Platten - ähnlich wie beim *Transwell-Migrationsassay* - verwendet, deren Membranen Poren von 8 µm Durchmesser aufwiesen. Zunächst wurden diese Membranen zweimal mit jeweils 12,5 µl der Matrigellösung (250 µg/ml) beschichtet und nach jeder Beschichtung für 30 min in einer Atmosphäre von 37 °C und 5 % CO₂ getrocknet. In die unteren Kammern der *Transwellssysteme* wurden je 500 µl konditioniertes Medium pipettiert. Dieses bestand aus zellfreiem Optimem-Medium, das sich zuvor 24 Stunden auf nahezu konfluenten Cos-7-Zellen (J. G. Collard, Amsterdam, Niederlande) befand. In die oberen Kammern wurden Einzelzellsuspensionen von 50 000 Zellen in 50 µl Optimem-Medium gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation der *Transwellplatten* für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Im Anschluss daran wurden die invadierten Zellen wie beim *Transwell-Migrationsassay* fixiert, angefärbt und luftblasenfrei auf Deckgläsern befestigt (vgl. III.4.3.1). Am Lichtmikroskop wurden die invadierten Zellen gezählt. Die verschiedenen Zelllinien wurden jeweils in einem Sechsfachansatz getestet und der Versuch wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit SPSS 14.0, wobei der nichtparametrische Mann-Whitney-Test verwendet wurde und das Signifikanzniveau mit $p < 0,05$ festgelegt wurde.

4.5 Transformationsassays

Um die transformierenden Eigenschaften des Tiam1/Rac-Signalwegs an benignen prostaticen Zellen genauer zu analysieren, wurden die BPH-Zellen zunächst stabil mit verschiedenen Rac3- und Tiam1-Konstrukten transfiziert und anschließend in zwei verschiedenen *Transformationsassays*, dem *Soft agar assay* und dem *Colony formation assay*, untersucht.

4.5.1 Soft agar assay

Benigne Zellen können sich nur vermehren, wenn sie Kontakt zu einem spezifischen Untergrund besitzen. Transformierte Zellen dagegen erlangen die Eigenschaft des sogenannten verankerungsunabhängigen Wachstums (*anchorage-independent growth*), wodurch sie durch autonomes Wachstum auch dann Kolonien bilden können, wenn sie in Weichagar eingebettet sind und kein Kontakt zu einem Untergrund zur Verankerung möglich ist. Diese Fähigkeit zur adhäsionsunabhängigen Proliferation in einem Weichagar, die also

nur transformierte Zellen besitzen, wird mithilfe des *Soft agar assays* untersucht (Clark et al., 1995; Mareel und Leroy, 2003; Schmitz et al., 2000; Wagener und Müller, 2010).

Hierzu wurden zunächst *6-wells* mit 3 ml *Baselayer* beschichtet und über Nacht zum Aushärten bei 4 °C gelagert. Der *Baselayer* enthielt neben Wachstumsmedium auch 0,5%ige *Low-Melt*-Agarose, die zuvor autoklaviert und UV-sterilisiert wurde. Er diente als Nahrungsreservoir und verhinderte eine Adhäsion der Zellen an der Zellkulturschale. Die ausgehärtete Agarschicht wurde am nächsten Tag mit 860 µl eines 0,4%igen *Toplayers* überschichtet, der 2500 in Medium suspendierte BPH-1-Zellen enthielt. Um den entsprechenden Agar bei der Herstellung der Schichten flüssig zu halten, wurden alle Zusätze bei 37 °C im Wasserbad angewärmt bzw. die *Low-Melt*-Agarose bei 80 °C geschmolzen und anschließend auf 37 °C abgekühlt. Nachdem auch der *Toplayer* zum Aushärten 15 min im Kühlschrank gekühlt wurde, erfolgte anschließend die Inkubation der *Soft-agar*-Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Feuchtinkubator über mehrere Wochen. Regelmäßig wurde der Agar mit ein paar Tropfen RPMI-Medium angefeuchtet. Das Verhalten der in Agar eingebetteten Zellen und die eventuelle Kolonienbildung wurden im Verlauf unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet und fotografiert.

4.5.2 Colony formation assay

Mithilfe des *Colony formation assays* wird die Fähigkeit von Zellen zur malignen Transformation *in vitro* untersucht (Engers et al., 2000; Moiola et al., 2010; Tao et al., 2008). Bei benignen Zellen kommt es im konfluenten Zustand in der Regel zu einem Wachstumsstopp durch Dichtehemmung. Allerdings verlieren onkogen transformierte Zellen normalerweise dieses kontakthemmende Wachstum, so dass sich dreidimensionale Kolonien bilden (Wagener und Müller, 2010).

Für diesen Versuch wurden daher die stabil transfizierten BPH-Zellen im konfluenten Zustand für bis zu acht Wochen in Standardzellkulturmedium kultiviert. Dreimal pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel, nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden. Mit dem Phasenkontrastmikroskop wurde die Fähigkeit zur Kolonienbildung beobachtet und fotografiert.

IV. ERGEBNISSE

1 Umklonierung und stabile Transfektion von BPH-1-Zellen

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Rho-ähnliche GTPase Rac3 als auch der Rac-spezifische Aktivator Tiam1 im Prostatakarzinom signifikant überexprimiert werden. Da diese Überexpressionen zudem signifikant miteinander korrelierten, kann davon ausgegangen werden, dass wahrscheinlich neben einer gesteigerten Rac-Expression auch eine erhöhte Rac-Aktivität in diesem Karzinom vorliegt (Engers et al., 2006a; Engers et al., 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun die funktionelle Relevanz von Rac3 und Tiam1 für die Entstehung des Prostatakarzinoms unter experimentellen Bedingungen untersucht werden. Als Modellsystem dafür erschien die benigne immortalisierte nicht-tumorigene menschliche Prostataepithelzelllinie BPH-1 gut geeignet, welche mit verschiedenen Rac3- und Tiam1-Konstrukten stabil transfiziert werden sollte.

Als Vektor wurde der retrovirale Vektor pLZRS-IRES gewählt, der entweder ein Blasticidin-(Bsd)- oder Zeocin-(Zeo)-Resistenzgen trug, um die Selektion stabil transfizierter Zellen in einem Blasticidin- bzw. Zeocinhaltigen Medium zu ermöglichen. Dieser Vektor wurde bislang in mehreren Veröffentlichungen zur Überexpression verschiedener Tiam1- und Rac-Konstrukte verwendet (Mertens et al., 2005; Michiels et al., 2000; Sander et al., 1998).

Damit sich alle Konstrukte in demselben Vektor befanden, mussten zunächst zwei verschiedene Rac3-cDNAs (Flag-wt-Rac3, Flag-V12-Rac3) in den retroviralen Vektor pLZRS-IRES umkloniert werden. Die Flag-wt-Rac3-codierende Sequenz wurde dazu aus dem Ausgangsvektor-Plasmid pcDNA (von Dr. J. G. Collard, Amsterdam, zur Verfügung gestellt) herausgeschnitten und in den pLZRS-IRES-Bsd-Vektor bzw. in den pLZRS-IRES-Zeo-Vektor einkloniert, während die Flag-V12-Rac3-codierende Sequenz aus einem anderen Klonierungsvektor-Plasmid (cDNA3.1, ebenfalls freundlicherweise von Dr. J. G. Collard, Amsterdam, zur Verfügung gestellt) herausgeschnitten und nur in den pLZRS-IRES-Bsd-Vektor kloniert wurde (vgl. II.8).

Hierfür wurde die DNA-Sequenz von Flag-wt-Rac3 zuerst mit dem Restriktionsenzym SacI, die Sequenz von Flag-V12-Rac3 mit NheI und die Vektoren pLZRS-IRES-Bsd bzw. pLZRS-IRES-Zeo mit Swal inkubiert. Da die überhängenden Enden nach der Restriktion mit SacI und NheI nicht komplementär zu den glatten Enden nach Restriktion mit Swal waren, wurden sie mithilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt (vgl. III.1.5.2). Anschließend wurden alle Ansätze mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut. Dadurch entstanden ca. 750 bp große Flag-wt-Rac3- bzw. Flag-V12-Rac3-Fragmente. Diese wurden nach Elution aus einem

Agarosegel und nachfolgender Aufreinigung (III.1.5.4) in die geschnittenen und an den 5'-DNA-Enden dephosphorylierten Vektoren ligiert (vgl. III.1.5.3 und III.1.5.5). Im Verlauf wurde der Ligationsansatz in kompetente Bakterienzellen transformiert (vgl. III.1.5.6). Positive Klone wurden anschließend mithilfe einer Kolonie-PCR identifiziert (vgl. III.1.5.7) und eine Plasmid-Mini-Präparation wurde durchgeführt. Nach Sequenzierung der Konstrukte erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA mithilfe des *Plasmid-Maxi-Kits* (vgl. III.1.1). Die dadurch erhaltene Plasmid-DNA konnte nun für die stabile Transfektion eingesetzt werden.

Die beiden restlichen Plasmidkonstrukte FL-Tiam1 und C1199-Tiam1 im pLZRS-IRES-Bsd-Vektor wurden freundlicherweise von Dr. J. G. Collard (Amsterdam) zur Verfügung gestellt.

Mithilfe der X-Gal-Färbung wurden anschließend die besten Bedingungen sowie das beste Transfektionsreagenz zur Transfektion von BPH-1-Zellen ermittelt (vgl. III.2.2.1). Hierbei stellte sich ein Verhältnis von 1:6 zwischen Plasmid-DNA und dem Transfektionsreagenz FuGENE 6 als optimal heraus. Mithilfe von FuGENE 6 wurden daher die BPH-1-Zellen stabil mit dem leeren Vektor pLZRS-IRES-Bsd (mock) und mit einem pLZRS-IRES-Bsd-Vektor, in den jeweils die entsprechende cDNA-Sequenz von Flag-wt-Rac3 (wt-Rac3), konstitutiv aktivem Flag-V12-Rac3 (V12-Rac3), FL-Tiam1 (FL-Tiam) oder konstitutiv aktivem C1199-Tiam1 (C1199-Tiam) kloniert wurde, transfiziert (vgl. III.2.2.2). Außerdem erfolgte eine Ko-Transfektion der beiden leeren Vektoren pLZRS-IRES-Bsd und pLZRS-IRES-Zeo (mock/mock) sowie eine Ko-Transfektion von FL-Tiam im pLZRS-IRES-Bsd-Vektor mit Flag-wt-Rac3 im pLZRS-IRES-Zeo-Vektor (FL-Tiam/wt-Rac3), um eine gleichzeitige Überexpression von FL-Tiam und wt-Rac3 – wie *in vivo* beim Prostatakarzinom und der HG-PIN beschrieben (Engers et al., 2006a; Engers et al., 2007) – in den BPH-1-Zellen zu erreichen. Im Folgenden werden die transfizierten Zellen zur Vereinfachung nur noch wie in Klammern angegeben genannt.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind alle in dieser Arbeit verwendeten transfizierten Zelllinien noch einmal in Tabelle II.2 (S. 34) aufgelistet. Zusammengefasst bestehen die in dieser Arbeit untersuchten sieben Zelllinien also aus den mock-transfizierten Kontrollzellen sowie aus Zellen, die jeweils mit einer Wildtyp- oder einer konstitutiv aktiven Form von Rac3 bzw. Tiam1 transfiziert oder mit beiden Wildtypformen ko-transfiziert wurden. Da die Tiam1-transfizierten Zellen genauso wie die ko-transfizierten Zellen erst später im Verlauf dieser Arbeit hinzukamen, wurden aus zeitlichen Gründen einzelne Versuche nur mit den Rac3-transfizierten Zellen durchgeführt.

Der Transfektionserfolg wurde in Western Blots aus totalen Zelllysaten nachgewiesen (Abb. IV.1). Um zu zeigen, dass die entsprechende Proteinexpression nicht auf einer ungleichmäßigen Proteinbeladung der Gele beruht, wurde die gleiche Membran mit einem Antikörper

gegen α -Tubulin reinkubiert. Die Überexpression von Rac3 wurde zum einen mithilfe eines gegen Rac1 gerichteten Antikörpers, der auch Rac3 erkennt, verifiziert (Abb. IV.1 B). Da das ektopisch überexprimierte Rac3 mit einem Flag-Tag markiert war, war dieses Protein größer als endogenes Rac und wanderte dementsprechend in der SDS-Page langsamer. Daher zeigten sich erwartungsgemäß Doppelbanden in den Zelllinien, in denen Flag-markiertes Rac3 überexprimiert wurde, nämlich in wt-Rac3, konstitutiv aktivem V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3. Die jeweils unteren Banden wiesen endogenes Rac nach, das sich in epithelialen Zellen aus Rac1 und Rac3 zusammensetzt. Die Überexpression von Flag-markiertem Rac3 in wt-Rac3 und V12-Rac3 wurde zum anderen mithilfe eines gegen den Flag-Tag gerichteten Antikörpers nachgewiesen (Abb. IV.1 A). Die Flag-Expression der ko-transfizierten Zelllinien (mock/mock und FL-Tiam/wt-Rac3) wurde allerdings nicht mit diesem Antikörper untersucht.

Auch die Überexpression von Tiam1 konnte erwartungsgemäß in FL-Tiam, C1199-Tiam und FL-Tiam/wt-Rac3 verifiziert werden (Abb. IV.1 C). Da es sich bei C1199-Tiam1 um eine am N-Terminus *trunkierte* Mutante des normalen Volllängen-Proteins (FL-Tiam1) handelt, die nur aus den C-terminalen 1199 Aminosäuren besteht, unterscheiden sich die beiden Proteine in ihrer Größe (vgl. Abb. I.4). C1199-Tiam ist kleiner und wanderte daher in der SDS-Page wie erwartet schneller als FL-Tiam.

Mithilfe des *Rac-Aktivitätsassays* wurde die Aktivität von Rac in den mit Rac3- und Tiam1-transfizierten BPH-1-Zellen untersucht (Abb. IV.2).

Hierbei zeigte sich im Gegensatz zu den mock-transfizierten Kontrollzellen, bei denen kein aktives Rac (mock) bzw. kaum aktives Rac (mock/mock) nachgewiesen werden konnte, eine sehr starke Aktivierung von Rac3 sowohl bei konstitutiv aktivem V12-Rac3 als auch bei ko-transfiziertem FL-Tiam/wt-Rac3, wobei die Aktivität von Rac3 in V12-Rac3 wesentlich stärker als in FL-Tiam/wt-Rac3 war.

Im Vergleich dazu wies wt-Rac3 nur eine sehr schwache angedeutete Aktivität des zusätzlich transfizierten Rac3 auf. FL-Tiam und C1199-Tiam zeigten eine schwache Aktivierung von endogenem Rac. Die in anderen Zelllinien beschriebene relativ starke Aktivierung von endogenem Rac durch den stabileren, Rac-spezifischen Aktivator C1199-Tiam1 konnte damit überraschenderweise in den BPH-1-Zellen nicht bestätigt werden (Engers et al., 2006b).

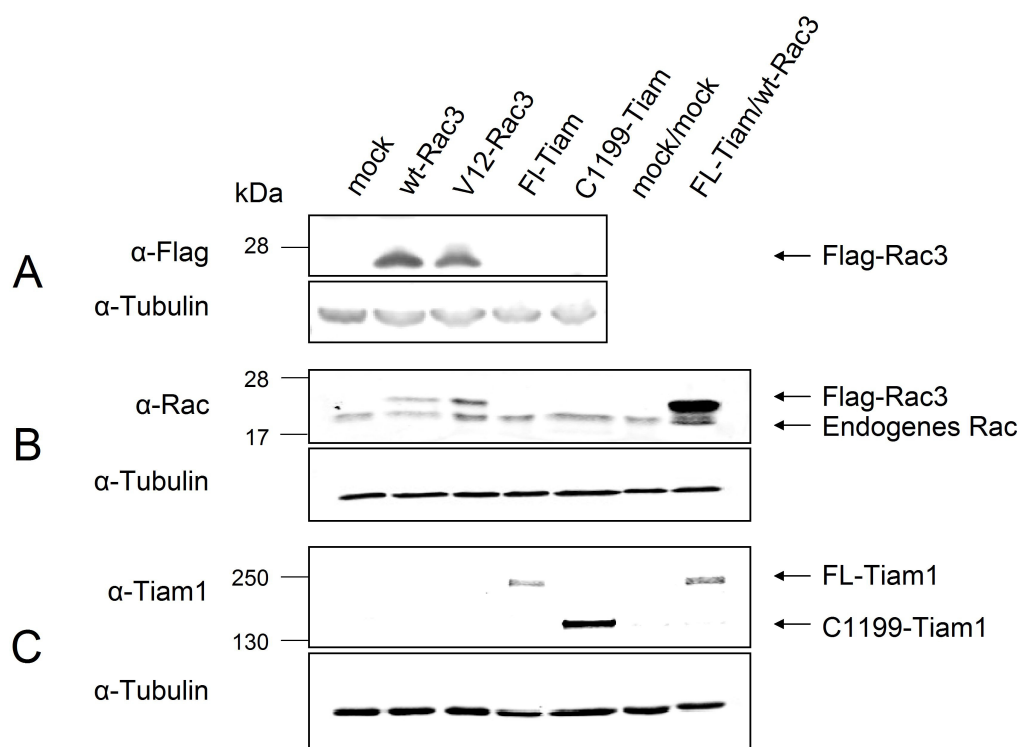


Abb. IV.1 Immunologischer Nachweis der Überexpression verschiedener Rac3- (A, B) und Tiam1-Proteine (C) in BPH-1-Zellen nach stabiler Transfektion mit FuGENE 6.

Die Bestimmung der Proteinexpression aus totalen Zelllysaten erfolgte im Western Blot. Das jeweils obere Bild zeigt den Nachweis des entsprechenden Proteins. Das jeweils untere Bild zeigt dieselbe Membran nach Reinkubation mit einem Antikörper gegen α -Tubulin, um eine gleichmäßige Proteinauftragung zu verifizieren.

(A) Nachweis der Expression von transfiziertem Flag-markiertem Rac3 mit einem Antikörper gegen Flag. Die ko-transfizierten Zelllinien (mock/mock und FL-Tiam/wt-Rac3) wurden nicht mit diesem Antikörper untersucht.

(B) Nachweis der Expression von Rac durch einen Rac1-Antikörper, der auch Rac3 erkennt. Da exogenes Rac3 mit einem Flag-Tag markiert ist, ist das Protein größer als endogenes Rac und wandert im SDS-Page langsamer. Daher sind in den Zelllinien, in denen Flag-markiertes Rac3 überexprimiert wird, Doppelbanden vorhanden.

(C) Analyse der Tiam1-Expression.

Die Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei voneinander unabhängig durchgeführte Western-Blot-Untersuchungen.

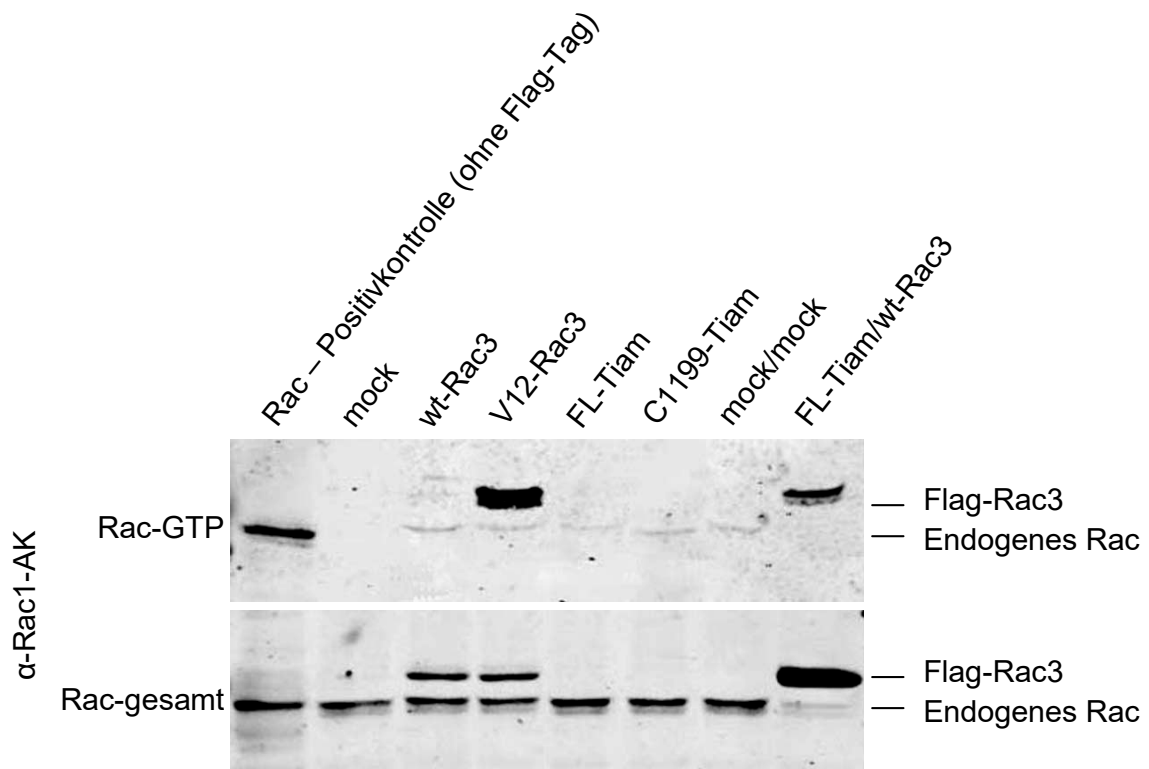


Abb. IV.2 Vergleich der Rac-Aktivität verschiedener Rac3- und Tiam1-transfizierter BPH-1-Zellen mit Leervektor-transfizierten Kontrollzellen im Rac-Aktivitätsassay.

Es wurde ein Rac-Aktivitätsassay durchgeführt und anschließend die Menge an aktivem GTP-gebundenem Rac sowie Rac-gesamt im Immunoblot mit einem spezifischen Rac-Antikörper, der auch Rac3 erkennt, bestimmt. Durch Vergleich der Banden von Rac-GTP und Rac-gesamt ist es möglich, Aussagen über den Gehalt an aktivem Rac zu machen. In den Zelllinien, in denen Flag-markiertes Rac3 (Flag-Rac3) überexprimiert wird, sind Doppelbanden zu erkennen, da endogenes Rac ohne Flag-Tag kleiner ist und damit in der SDS-Page schneller wandert. Daher entspricht die obere Bande Flag-markiertem Rac3 und die untere Bande endogenem Rac, welches sich aus endogenem Rac1 und Rac3 zusammensetzt. Diese Abbildung ist repräsentativ für mindestens vier unabhängige Versuche. Rac-GTP: aktives Rac, Rac-gesamt: Rac-Expression im totalen Zelllysate.

2 Zellbiologische Effekte von Rac3 und Tiam1

Maligne Tumorzellen sind durch den Erwerb verschiedener Eigenschaften gekennzeichnet. Dazu zählen zum Beispiel eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit, eine Veränderung der Zell-Zelladhäsion, eine abnorme Zellmorphologie mit Differenzierungsverlust sowie die Fähigkeit zur Migration und Invasion (Hanahan und Weinberg, 2000). Weiterhin sind Tumorzellen insbesondere durch autonomes Wachstum geprägt, das zu einem Verlust der Kontaktinhibition und Wachstumskontrolle durch den Zellverband sowie zum Verlust des verankerungsabhängigen Wachstums führt (Hanahan und Weinberg, 2000; Wagener und Müller, 2010). Um die Effekte von Rac3 und Tiam1 auf benigne prostatiche Epithelzellen genauer zu untersuchen, wurden daher diverse zellbiologische Funktionsuntersuchungen durchgeführt.

2.1 Proliferationsaktivität

Um das Proliferationsverhalten der mit verschiedenen Rac3- und Tiam1-transfizierten BPH-1-Zellen zu überprüfen, wurde ein sogenannter XTT-Test (vgl. III.4.1.1) durchgeführt. Dieser ergab für alle Zelllinien einen sigmoidalen Verlauf der Wachstumskurven (Abb. IV.3). Die Kurven waren dabei durch eine relativ langsame Proliferation zu Beginn, eine stärkere Proliferation in der Mitte und eine wiederum schwache Proliferation bzw. sogar Zellabnahme gegen Ende des Versuchs charakterisiert.

Beim Vergleich der Wachstumsrate der einzelnen Zelllinien mit den Leervektor-transfizierten Kontrollzellen über die Dauer des gesamten Versuchs zeigte nur C1199-Tiam eine sehr viel langsamere Proliferation. Das Wachstum der anderen Zelllinien insbesondere von mock und wt-Rac3 bzw. mock/mock und FL-Tiam/wt-Rac3 verlief dagegen sehr ähnlich. Auffällig war das Wachstumsverhalten von V12-Rac3, das zwar zu Beginn mit mock vergleichbar war, in den Tagen 2 und 3 dagegen etwas schneller verlief, um ab dem 4. Tag wieder einzubrechen und am 6. Tag sogar zu einer Abnahme vitaler Zellen zu führen. Um dieses Wachstumsverhalten besser analysieren zu können, wurde anhand der Daten für die Wachstumskurven die maximale Proliferationsaktivität (Abb. IV.4 A) und die Sättigungsdichte (Abb. IV.4 B) der untersuchten Zelllinien bestimmt. Außerdem wurde die statistische Signifikanz der Ergebnisse mit $p < 0,05$ im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Kontrollzellen überprüft.

Bei der maximalen Proliferationsaktivität handelt es sich um die stärkste Absorptionszunahme innerhalb von 24 Stunden und damit um den steilsten Bereich in der Wachstumskurve. Zwar wurde die maximale Proliferationsaktivität von den verschiedenen Zelllinien zu unterschiedlichen Zeiten erreicht, allerdings unterschieden sich die Werte nur bei C1199-Tiam

signifikant von mock ($p=0,004$). Das bedeutet, dass nur C1199-Tiam zu einer Proliferationshemmung führte. Im Gegensatz dazu wurde die maximale Proliferationsaktivität durch wt-Rac3, V12-Rac3, FL-Tiam und FL-Tiam/wt-Rac3 im Vergleich zu den mock-transfizierten Kontrollzellen nicht signifikant verändert. Nur ihr zeitliches Auftreten wies Unterschiede auf. Die Sättigungsdichte (Abb. IV.4 B), die der Zellzahl pro Fläche entspricht, bei der es zu einem Proliferationsstopp der Population kommt, wurde aus dem Quotienten vom Absorptionsmaximum einer Zelllinie und der Fläche eines 96-wells berechnet. Hierbei zeigten sich im Vergleich zu mock signifikant niedrigere Werte für V12-Rac3, FL-Tiam und C1199. Bei diesen drei Zelllinien lag also ein Proliferationsstopp bei geringerer Zellzahl pro Fläche im Vergleich zu mock vor.

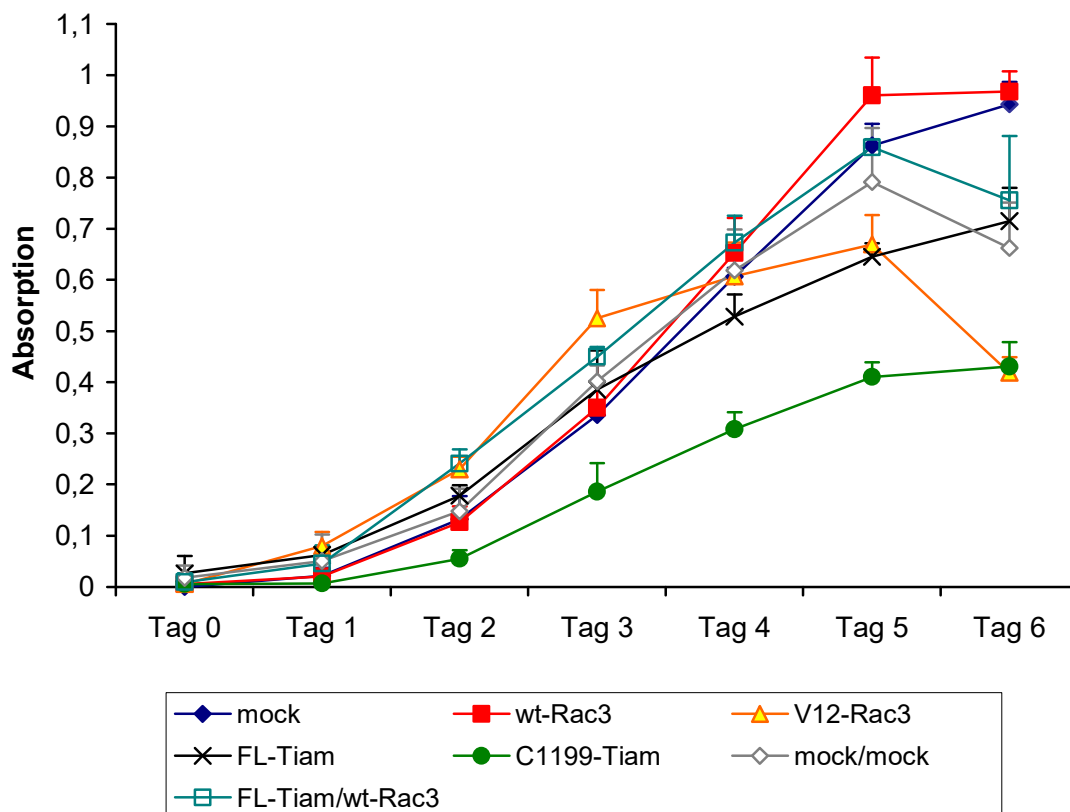


Abb. IV.3 Darstellung des Proliferationsverhaltens der mit Rac3- und Tiam1-transfizierten BPH-1-Zellen mithilfe des XTT-Proliferations-Assays.

Die Intensität der Absorption verhält sich proportional zur Anzahl lebender Zellen und ist daher im Verlauf mehrerer Tage ein Maß für die Proliferation. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus sechs Messwerten der verschiedenen Well-Vertiefungen. Aus Übersichtsgründen wurden die Standardabweichungen nur in eine Richtung dargestellt.

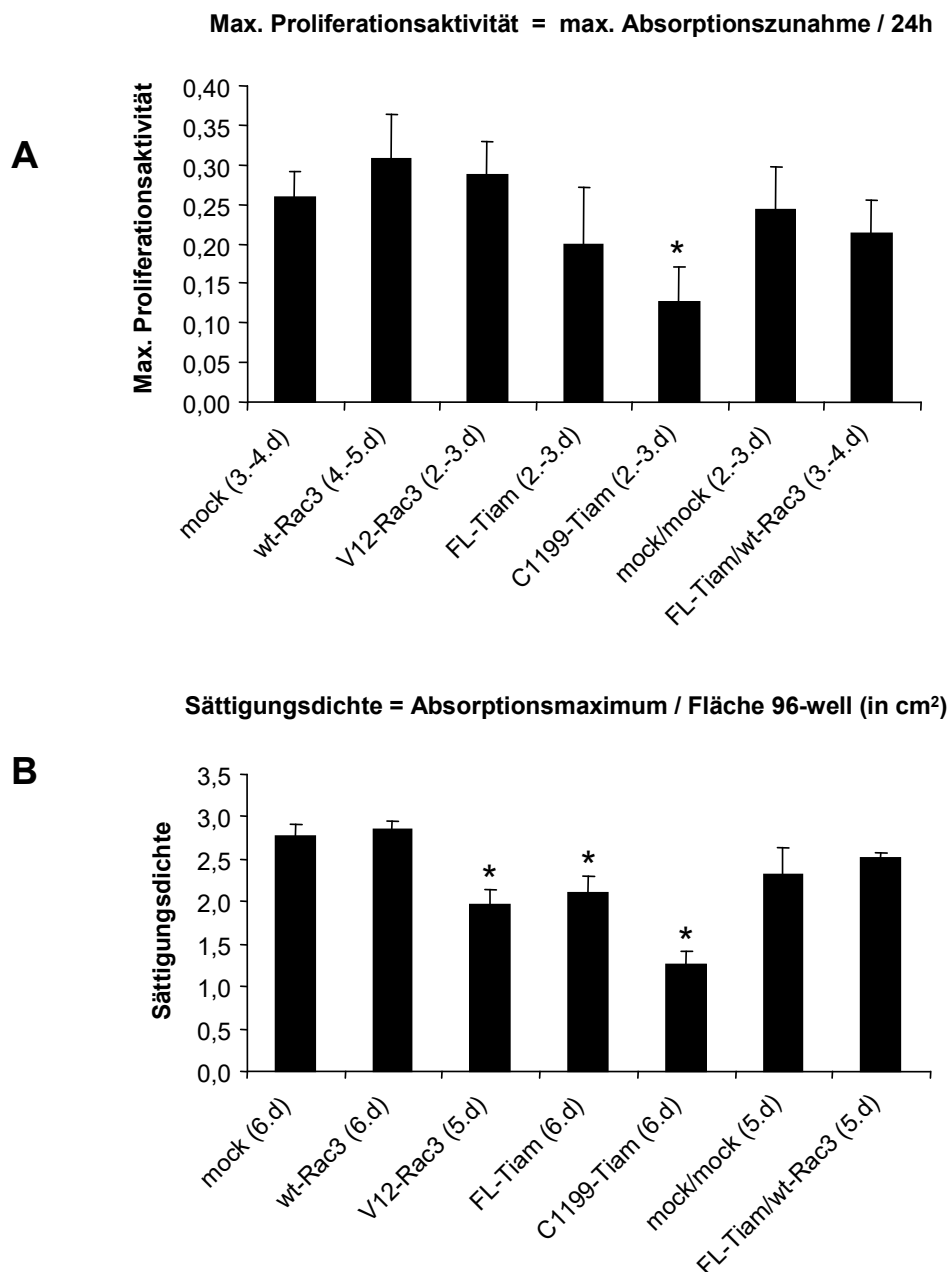


Abb. IV.4 Auswertung des Proliferationsverhaltens der mit Rac3- und Tiam1- transfizierten BPH-1-Zellen mithilfe des XTT-Proliferations-Assays.

Mit * markierte Säulen repräsentieren ein statistisch signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$) im Vergleich zum Leervektor (mock bzw. mock/mock) im nichtparametrischen doppelseitigen Mann-Whitney-Test.

(A) Vergleich der maximalen Proliferationsaktivität, welche sich aus der maximalen Absorptionszunahme innerhalb von 24 Stunden ergibt, die im steilsten Bereich der Proliferationskurve der jeweiligen Zelllinie vorhanden ist (vgl. Abb. IV.3). Auf der Abszisse ist die jeweilige Zelllinie mit den entsprechenden Tagen angegeben, zwischen denen die maximale Proliferationsaktivität erreicht wird.

(B) Vergleich der Sättigungsdichte, welche sich aus dem Quotienten aus absolutem Absorptionsmaximum einer entsprechenden Zelllinie und der Fläche eines 96-wells ergibt (vgl. Abb. IV.3). Auf der Abszisse ist die jeweilige Zelllinie mit dem entsprechenden Tag angegeben, an dem die maximale Absorption und damit auch die Sättigungsdichte erreicht werden.

Zusammengefasst führte C1199-Tiam demnach zu einer Verlangsamung des Wachstums. Außerdem besaß es auch eine geringere Sättigungsdichte als die mock-transfizierten Kontrollzellen. V12-Rac3 und FL-Tiam dagegen wiesen zwar keinen signifikanten Effekt auf die maximale Proliferationsaktivität auf, allerdings waren auch diese Zelllinien durch eine signifikant niedrigere Sättigungsdichte charakterisiert. Damit kann festgehalten werden, dass V12-Rac3 im Vergleich zu mock zwar zu Beginn nach der Zellaussaat etwas schneller proliferierte und damit die maximale Proliferationsaktivität schneller erreichte, dass sich die beiden Zelllinien in der maximalen Proliferationsaktivität selbst aber nicht unterschieden. Die Sättigungsdichte war bei V12-Rac3 dagegen signifikant niedriger als bei mock. Es konnte kein Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen mock und wt-Rac3 bzw. zwischen mock/mock und FL-Tiam/wt-Rac3 festgestellt werden.

Ein sehr ähnliches Proliferationsverhalten von mock, wt-Rac3 und V12-Rac3 – wie im XTT-Test ermittelt – konnte in einem aufwendigeren Versuch durch direkte Zellzählung (III.4.1.2) bestätigt werden (Abb. IV.5). Auch hier war kein Unterschied im Wachstum zwischen mock und wt-Rac3 erkennbar, während V12-Rac3 zwar nach drei bis fünf Tagen zunächst etwas schneller proliferierte als mock, ab dem sechsten Tag allerdings wieder eine vergleichbare Zellzahl aufwies und danach sogar zu einer Verminderung der Zellzahl führte. Die niedrigere Sättigungsdichte sowie das schnellere Erreichen der maximalen Proliferationsaktivität von V12-Rac3 im Vergleich zu mock, die zuvor schon im XTT-Test gezeigt wurden, konnte daher auch nach Zellzählung bestätigt werden.

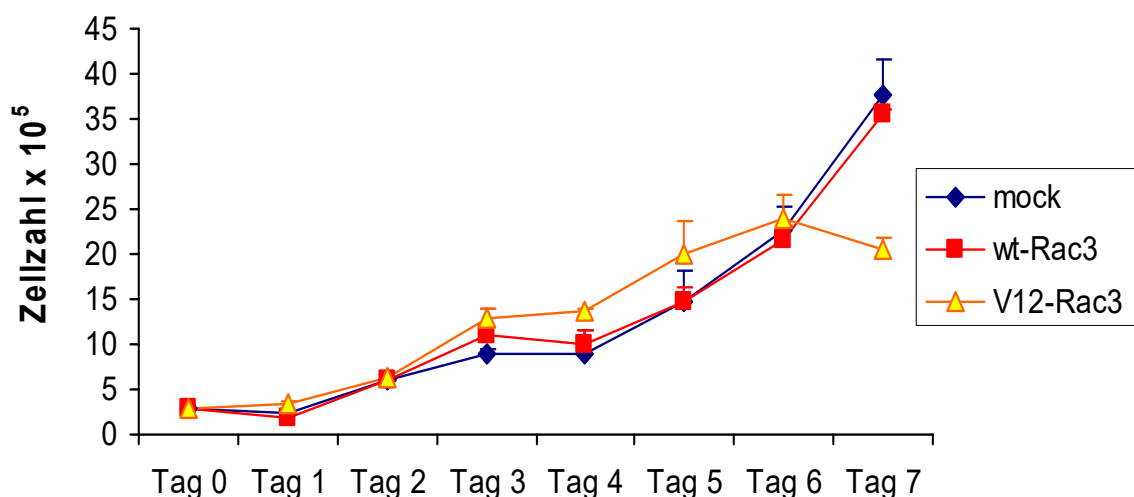


Abb. IV.5 Darstellung des Proliferationsverhaltens der mit Leervektor-, wt-Rac3- und V12-Rac3-transfizierten BPH-1-Zellen nach Zellzählung.

Nach Aussaat von jeweils 3000 Zellen pro Zelllinie am Tag 0 wurden die Zellen täglich gezählt und der Mittelwert aus drei verschiedenen Ansätzen pro Zelllinie gebildet. Die Standardabweichungen sind nur in eine Richtung dargestellt.

2.2 Zell-Zelladhäsion und Zellmorphologie

Bei der Untersuchung der transfizierten BPH-1-Zellen im Phasenkontrastmikroskop wurde sowohl auf Veränderungen der Zell-Zelladhäsion als auch der Zellmorphologie geachtet (Abb. IV.6).

Die mock-transfizierten Kontrollzellen (A, B) wuchsen dabei in ganz kompakten Zellinseln, die relativ glatte Konturen aufwiesen. Zudem waren leuchtende Interzellulärkontakte deutlich erkennbar. Dieses Wachstumsmuster deutet auf eine relativ starke Zell-Zelladhäsion hin. Außerdem besaßen diese Zellen einen überwiegend polygonalen epithelialen – teilweise aber auch angedeutet spindeligen – Phänotyp, bei dem die peripheren Zellgrenzen scharf wirkten und sich gut vom Hintergrund abhoben. *Membrane ruffling* war hier nicht erkennbar.

Im Gegensatz zur Expression von wt-Rac3 (C, D), das keine nennenswerten morphologischen Veränderungen im Vergleich zu mock-transfizierten Kontrollzellen induzierte, führte die Überexpression von V12-Rac3 (E, F) zu einer sehr deutlichen Beeinflussung der Zell-Zelladhäsion und Zellmorphologie. Das konstitutiv aktive V12-Rac3 bewirkte ein viel lockereres und dissoziiertes Wachstumsmuster verglichen mit mock-transfizierten Kontrollzellen. Zwar wiesen die Zellen auch einen epithelialen Phänotyp auf, allerdings waren sie wesentlich größer als mock-transfizierte Kontrollzellen. Die peripheren Zellgrenzen waren kaum erkennbar, da sich die Zellen sehr flach auf dem Zellkulturflaschenboden ausbreiteten. Bei genauerer Betrachtung mit starker Vergrößerung war ein starkes *membrane ruffling* dieser Zellen erkennbar. Auffällig war zudem eine deutlich reduzierte Zell-Zelladhäsion.

Das Wachstumsmuster von FL-Tiam (G, H) wiederum war mit dem von mock-transfizierten Kontrollzellen in ganz kompakten Zellverbänden vergleichbar. Allerdings wirkten die polygonalen, pflastersteinartig angeordneten Zellen etwas größer und noch epithelialer.

Ähnlich wie bei V12-Rac3 führte die Überexpression des konstitutiv aktiven C1199-Tiam (I, J) zu einem dissoziierten Wachstumsmuster mit lockeren Zell-Zellkontakten. Dabei wirkten die Zellen zwar größer als bei mock-transfizierten Kontrollzellen, aber etwas kleiner als bei V12-Rac3. Ähnlich wie bei V12-Rac3 war peripheres *membrane ruffling* vorhanden, aber etwas weniger stark ausgeprägt als bei V12-Rac3.

Während die mit beiden leeren Vektoren ko-transfizierten Kontrollzellen (mock/mock) (K, L) in etwa ein vergleichbares Wachstumsmuster wie mock-transfizierte Kontrollzellen aufwiesen, führte die Ko-Transfektion von FL-Tiam/wt-Rac3 (M, N) zu einer deutlichen Veränderung der Zell-Zelladhäsion und des Phänotyps, die den V12-Rac3-induzierten Veränderungen entsprachen.

Zusammenfassend führten demnach aktives Rac3 – in Form von konstitutiv aktivem V12-Rac3 und ko-transfiziertem FL-Tiam/wt-Rac3 – sowie C1199-Tiam1 jeweils zu einer deutlichen Hemmung der Zell-Zelladhäsion und einer Induktion von *membrane ruffling*. Beide Veränderungen sind Voraussetzung bzw. Zeichen für eine gesteigerte Zellmotilität und könnten somit auf einen aggressiven Phänotyp hindeuten.

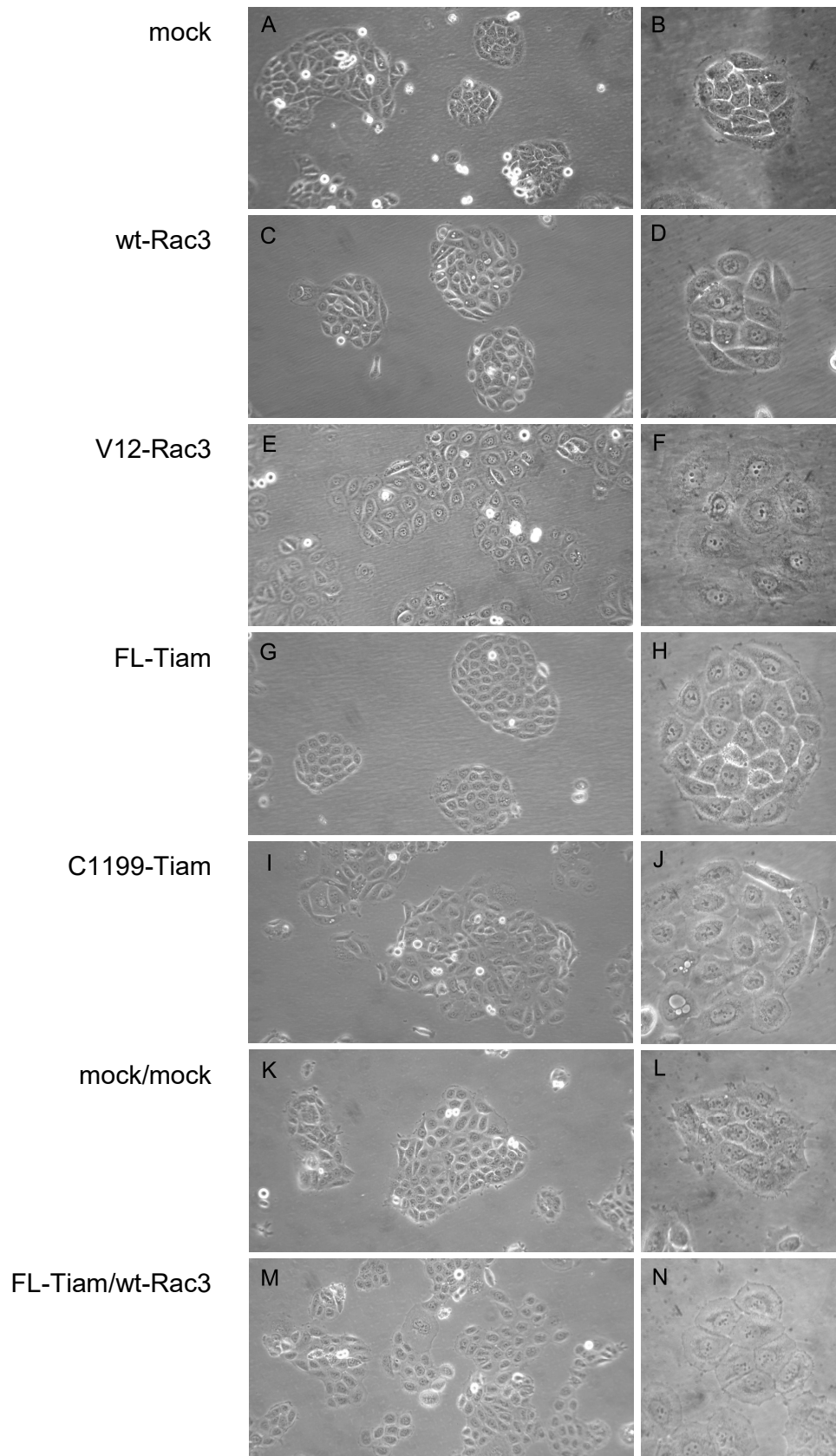


Abb. IV.6 Effekte von Rac3 und Tiam1 auf die Zell-Zelladhäsion und Zellmorphologie in BPH-1-Zellen.

Die dargestellten Bilder (Phasenkontrastmikroskop) sind repräsentativ für die jeweilige stabil transfizierte Zellpopulation. Mikroskopvergrößerung: Bilder der linken Spalte (**A, C, E, G, I, K und M**) jeweils x 100, Bilder der rechten Spalte (**B, D, F, H, J, L und N**) jeweils x 400.

2.3 Effekte auf die subzelluläre Verteilung des Aktinzytoskeletts

Die Rho-ähnliche GTPase Rac1 wird als ein Hauptregulator des Aktinzytoskeletts angesehen. Durch Aktinpolymerisation beeinflusst sie spezifisch die Lamellipodienbildung und das sogenannte *membrane ruffling* (Hall, 1998; Olson et al., 1995). Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von Rac3 auf das Aktinzytoskelett in BPH-1-Zellen wurden daher die mit wt-Rac3 und konstitutiv aktivem V12-Rac3 stabil transfizierten BPH-1-Zellen ebenso wie die mock-transfizierten Kontrollzellen mit TRITC-markiertem Phalloidin angefärbt und in der konfokalen Laser-Scanning-Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. IV.7). Der Versuch wurde bereits ziemlich zu Beginn des experimentellen Teils dieser Arbeit durchgeführt, wobei zu diesem Zeitpunkt die anderen Zelllinien noch nicht existierten und somit auch nicht untersucht wurden.

Es zeigte sich bei mock eine regelmäßige Lokalisation von F-Aktin entlang der Zellmembranen (Abb. 7 A – weißer Pfeil). Dabei war kaum F-Aktin im Zytoplasma erkennbar. Die Überexpression von V12-Rac3 dagegen bewirkte eine viel unregelmäßigere, wellige Anordnung des F-Aktins an der Zellmembran (Abb. 7 D – weißer Pfeil). Diese wellig dargestellten Zellgrenzen entsprechen dem sogenannten *membrane ruffling* (sog. peripheres *ruffling*), welches in der Darstellung der Zellen in einer anderen (apikalen) Ebene wie viele kleine „Fransen“ erschien (sog. apikales *ruffling*) (Abb. 7 E – weißer Pfeil). Zudem waren einzelne *Spikes* (Filopodien) bei V12-Rac3 erkennbar (Abb. 7 D – blauer Pfeil). Die Zell-Zellkontakte erschienen im Vergleich zu mock-transfizierten Kontrollzellen außerdem viel lockerer, da hier häufig ein Spalt zwischen benachbarten Zellmembranen zu klaffen schien (Abb. 7 D – grüner Pfeil). Weiterhin war bei V12-Rac3 auch wesentlich mehr F-Aktin im Zytoplasma vorhanden als bei der Vektorkontrolle (Abb. 7 D).

Die subzelluläre Verteilung des F-Aktins in den wt-Rac3-exprimierenden Zellen stellte sich dagegen wie ein intermediärer Phänotyp zwischen mock und V12-Rac3 dar. Während die abschnittsweise regelmäßige Lokalisation des F-Aktins an der Zellmembran eher den mock-transfizierten Zellen ähnelte (Abb. 7 B – weißer Pfeil), erschienen die Zell-Zellkontakte in anderen Bereichen wie bei V12-Rac3 doch welliger (Abb. 7 B – gelber Pfeil) und ein *membrane ruffling* war ebenfalls erkennbar (Abb. 7 C – weißer Pfeil).

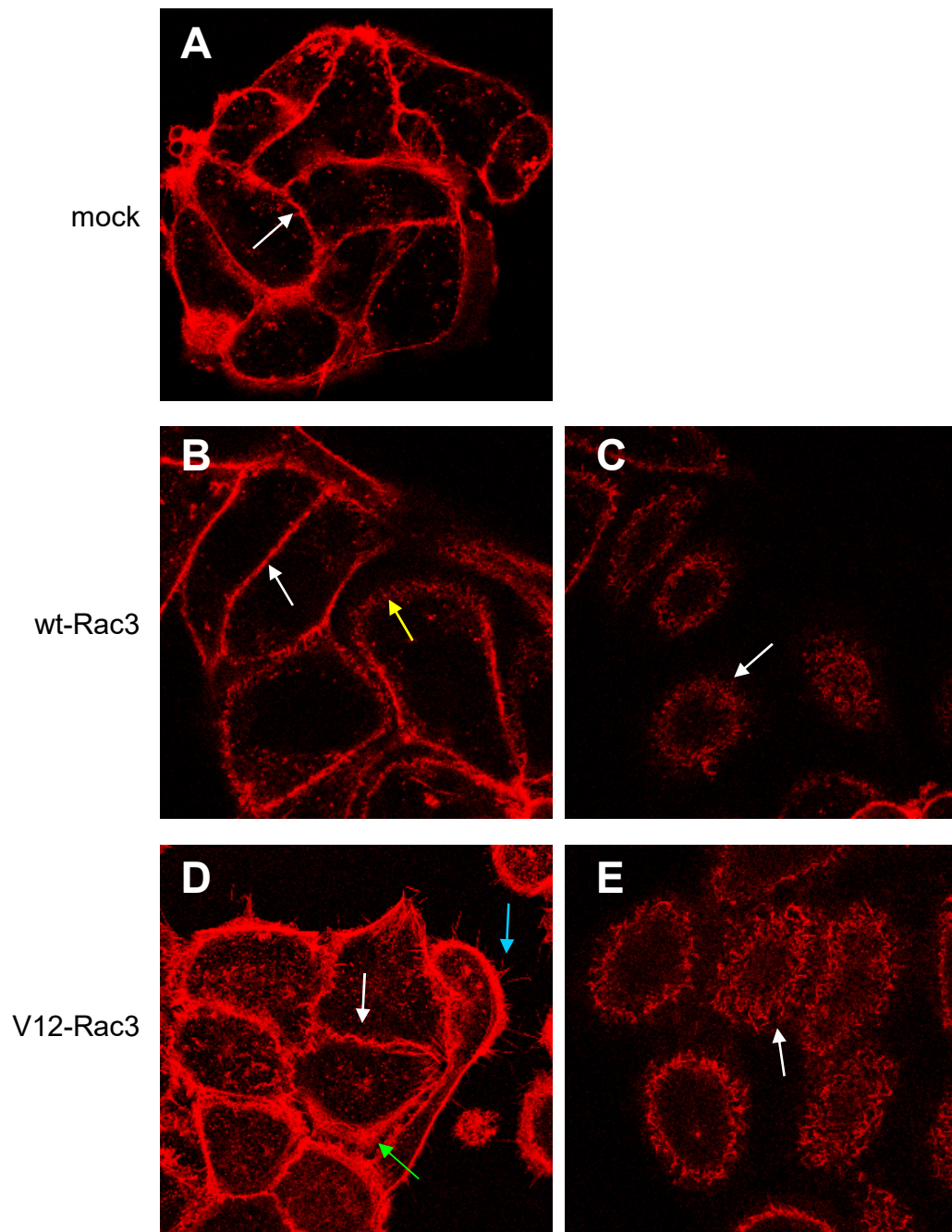


Abb. IV.7 Immunzytologischer Nachweis der subzellulären Verteilung von F-Aktin in mock-, wt-Rac3- und V12-Rac3-transfizierten BPH-1-Zellen.

Mithilfe der konfokalen Laser-Scanning-Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die stabil mit Rac3 transfizierten BPH-1-Zellen untersucht. Die Detektion von F-Aktin erfolgte mit TRITC-markiertem Phalloidin (rot). Die wt-Rac3- und V12-Rac3- transfizierten BPH-1-Zellen sind jeweils in zwei verschiedenen Ebenen dargestellt. Die linken Bilder stellen die subzelluläre Verteilung von F-Aktin in Querschnitten der transfizierten Zellen nahe der Kontaktfläche mit dem Deckglas (basal) dar. Die rechten Bilder dienen der Verdeutlichung des apikalen *membrane ruffings*. Jeweils 630x fache Mikroskopvergrößerung, allerdings wurden unterschiedlich große Ausschnitte gewählt.

2.4 Zell-Substratadhäsion an Laminin

Die Interaktion maligner Tumorzellen mit Komponenten der extrazellulären Matrix spielt eine wichtige Rolle während der Tumorinvasion. Dabei vermitteln insbesondere Integrine als substratspezifische Zelloberflächenrezeptoren die Zell-Substratadhäsion. Das Glykoprotein Laminin ist neben Kollagen Typ IV ein Hauptbestandteil von Basalmembranen. Durch lamininspezifische Integrinrezeptoren werden die Epithelzellen in nicht transformierten Geweben normalerweise an die Basalmembran angeheftet und damit stabilisiert. Im Gegensatz dazu scheint der Verlust dieser Bindungen und damit eine Verminderung der Zell-Substratadhäsion wichtig für die Tumorinvasion zu sein (Engers und Gabbert, 2000; Friedl und Wolf, 2003). Daher wurden in dieser Arbeit auch die Effekte von Rac3 und Tiam1 auf die Zelladhäsion an Laminin überprüft (Abb. IV.8). Hierbei induzierten die beiden konstitutiv aktiven Formen V12-Rac3 und C1199-Tiam sowie FL-Tiam/wt-Rac3 jeweils eine signifikante Adhäsionshemmung ($p < 0,001$) im Vergleich zu den mock-transfizierten Kontrollzellen, während die beiden Wildtyp-Formen wt-Rac3 ($p = 0,004$) und FL-Tiam ($p < 0,001$) zu einer signifikanten Steigerung der Zelladhäsion an Laminin führten.

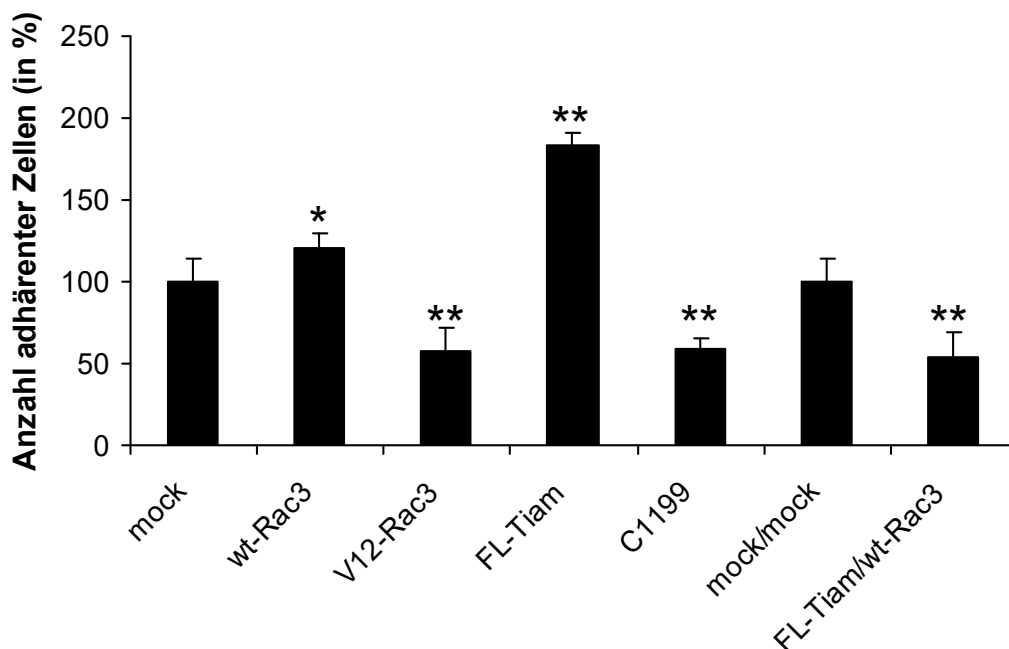


Abb. IV.8 Effekte von Rac3 und Tiam1 auf die Zell-Substratadhäsion an Laminin in BPH-1-Zellen.

Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. Die statistische Auswertung mit einem festgelegten Signifikanzniveau von $p < 0,05$ erfolgte mithilfe des nichtparametrischen doppelseitigen Mann-Whitney-Tests (* $p = 0,004$; ** $p < 0,001$).

2.5 Zellmigration

Um das Migrationsverhalten der mit verschiedenen Rac3- und Tiam1-Konstrukten transfizierten BPH-1-Zellen zu untersuchen, wurde der sogenannte *Transwell-Migrationsassay* durchgeführt (Abb. IV.9). Hierbei mussten Zellen aktiv durch Poren von Membranen, die mit Fibronectin beschichtet waren, migrieren. Es zeigte sich, dass insbesondere die beiden aktiven Formen V12-Rac3 und C1199-Tiam ebenso wie FL-Tiam/wt-Rac3 zu einer signifikanten und starken Steigerung der Migration im Vergleich zu den mock-transfizierten Kontrollzellen führten ($p < 0,05$). Auch wt-Rac3 führte zu einer signifikant erhöhten Migration ($p < 0,05$), während die Überexpression von FL-Tiam zwar tendenziell ebenfalls gesteigert war, allerdings keinen statistisch signifikanten Effekt ($p = 0,081$) bewirkte.

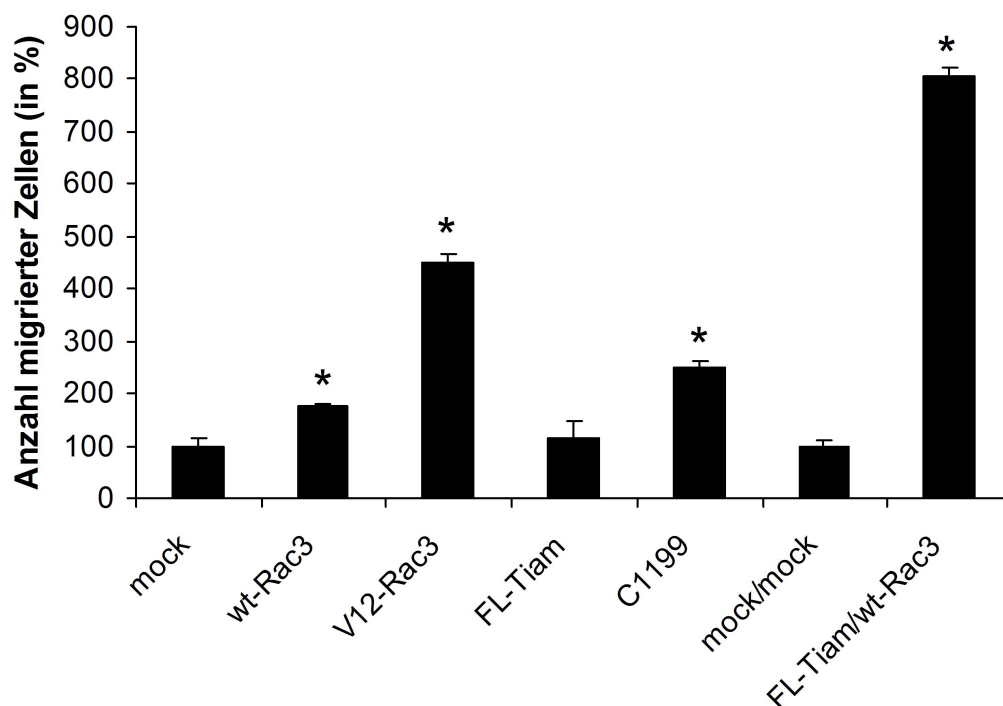


Abb. IV.9 Effekte von Rac3 und Tiam1 auf das Migrationsverhalten von BPH-1-Zellen im *Transwell-Migrationsassay*.

Die Zellen wurden auf fibronectinbeschichteten *Transwellmembranen* ausgesät. Migrierte Zellen wurden angefärbt und ausgezählt. Die dargestellten Werte ergaben sich als Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils sechs Messwerten eines Versuchs. Mit * markierte Säulen repräsentieren ein statistisch signifikantes Ergebnis mit einem festgelegten Signifikanzniveau von $p < 0,05$ im Vergleich zum Leervektor (mock bzw. mock/mock). Die statistische Auswertung erfolgte dabei mithilfe des nichtparametrischen doppelseitigen Mann-Whitney-Tests. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Darüber hinaus wurde für wt-Rac3 und V12-Rac3 zusammen mit den mock-transfizierten Kontrollzellen auch der sogenannte *Scratch assay* durchgeführt (Abb. IV.9 und Abb. IV.10). Es wurden nur diese Zelllinien getestet, da der Versuch zu Beginn der Dissertation erfolgte und zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar war, dass die restlichen Tiam1-transfizierten Zelllinien auch näher untersucht werden sollten.

Mithilfe des *Scratch assays* wurde die Fähigkeit der Zellen bestimmt, einen künstlich gesetzten Defekt in einem *Monolayer* durch aktive Migration mit Verlassen ihres Zellverbandes zu schließen. Wichtig für diesen Versuch war dabei das Ergebnis aus dem zuvor durchgeführten Proliferationsassay, dass Rac3 in den BPH-1-Zellen keinen nennenswerten Effekt auf die Proliferationsaktivität hatte. Die Breite dieser Defekte wurde an zehn verschiedenen, definierten Stellen sowohl zu Beginn als auch an den beiden folgenden Tagen ausgemessen. Für die statistische Auswertung war die aktiv migrierte Strecke der Zellen entscheidend, die sich aus der Differenz der jeweiligen Ausgangsbreite und der Breite nach aktiver Migration ergab.

Hierbei zeigte sich, dass sowohl V12-Rac3 als auch wt-Rac3 nach 32 Stunden eine signifikante Steigerung der Migration mit $p < 0,001$ im Vergleich zu den mock-transfizierten Kontrollzellen induzieren (Abb. IV.10 A, B). Die Quantifizierung der aktiv migrierten Strecke ergab ungefähr eine Verdopplung der Migrationsrate durch die Überexpression von V12-Rac3 (auf 219 %) bzw. wt-Rac3 (auf 190 %) (Abb. IV.10 B). Auch nach 53 Stunden zeigte sich für wt-Rac3 eine signifikant gesteigerte Migration mit $p < 0,001$, während für V12-Rac3 zu diesem Zeitpunkt kein Messwert mehr ermittelt werden konnte, da für diese Zelllinie die maximal zu migrierende Strecke an fast allen untersuchten Stellen schon zurückgelegt wurde (Abb. IV.10 A).

Zur Veranschaulichung wurde repräsentativ die Breite einer Stelle des Defekts nach 3, 11, 31 und 54 Stunden fotografiert (Abb. IV.11). Bei der Berechnung der aktiv migrierten Strecke wurde beachtet, dass die Ausgangsbreiten der Defekte unterschiedlich groß waren. Bereits nach 11 Stunden Inkubation zeigten V12-Rac3 und wt-Rac3 eine deutliche Migration in den künstlich gesetzten Defekt, während bei mock nur ein ganz geringer Effekt zu beobachten war. Nach 31 Stunden war bei V12-Rac3 bereits eine dünne, den Defekt vollständig ausfüllende Zellschicht sichtbar und nach 54 Stunden konnte der Defekt kaum noch identifiziert werden. Während der Defekt bei wt-Rac3 nach 54 Stunden geschlossen war, wurde dies bei den mock-transfizierten Zellen im Verlauf dieses Versuchs gar nicht erst erreicht.

Somit wurden im *Scratch assay* die im *Transwell-Migrationsassay* erzielten Ergebnisse von wt-Rac3 und V12-Rac3 bestätigt.

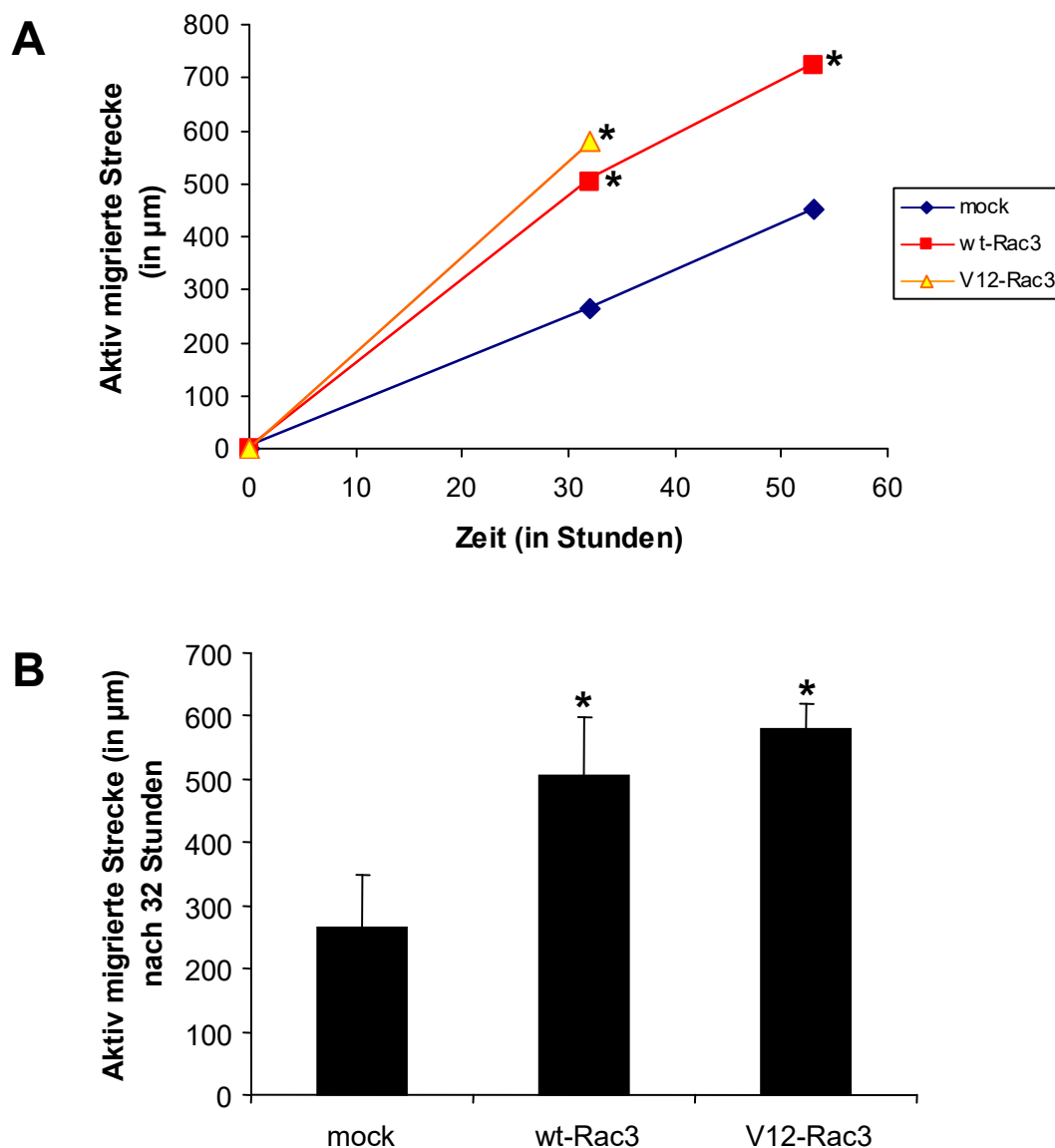


Abb. IV.10 Effekte von wt-Rac3 und V12-Rac3 auf das Migrationsverhalten im *Scratch assay*.

(A) Kinetik der Zellmigration. V12-Rac3 erreichte schon nach 32 Stunden in 50 % der Werte die maximal möglich zu migrierende Strecke. Daher existiert kein Messwert von V12-Rac3 nach 53 Stunden.

(B) Vergleich der aktiv migrierten Strecke nach 32 Stunden.

Ein künstlich gesetzter Defekt wurde durch aktive Migration der Zellen geschlossen. Die Breite der künstlich gesetzten Defekte jeder Zelllinie wurde an zehn verschiedenen, definierten Stellen sofort zu Beginn als auch in den beiden folgenden Tagen ausgemessen.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des nichtparametrischen doppelseitigen Mann-Whitney-Tests. In diesem war nicht die absolute Breite des Defekts ausschlaggebend, sondern die Differenz der jeweiligen Ausgangsbreite des Defekts und der entsprechenden Breite nach aktiver Migration. Daraus ergab sich die aktiv migrierte Strecke. Mit * markierte Werte repräsentieren statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ bei einem festgelegten Signifikanzniveau von $p < 0,05$ im Vergleich zum Leervektor (mock). Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

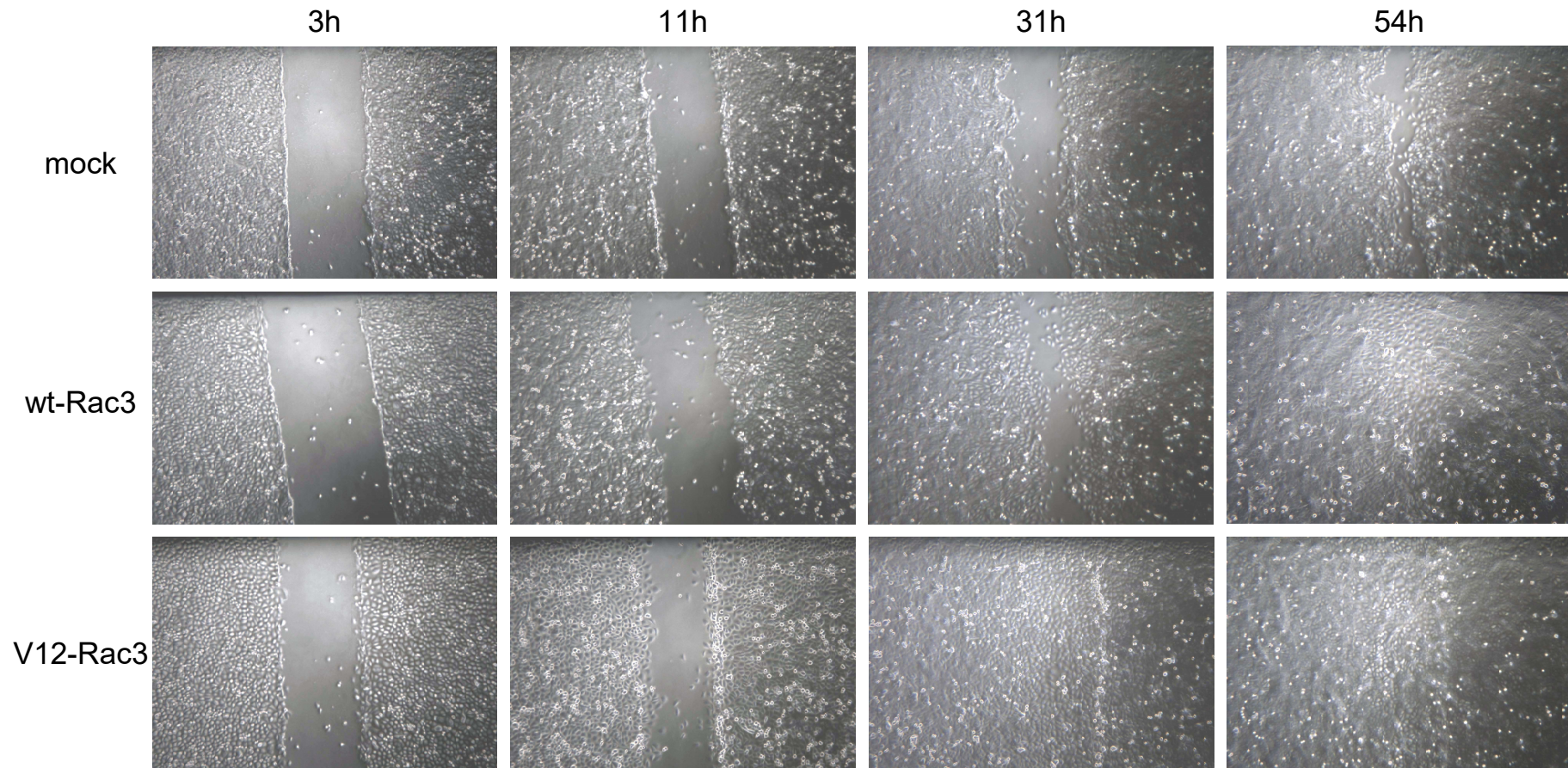


Abb. IV.11 Effekte von wt-Rac3 und V12-Rac3 auf das Migrationsverhalten im *Scratch assay*.

Ein künstlich gesetzter Defekt wurde durch aktive Migration der Zellen geschlossen. Repräsentativ wurde die Breite eines definierten Defekts nach 3, 11, 31 und 54 Stunden fotografiert. Mikroskopvergrößerung: jeweils x 100.

2.6 Invasionsverhalten

Da es sich bei BPH-1-Zellen um benigne Zellen handelt, die in der Regel nicht zur Invasion von Basalmembranen fähig sind, war eine Untersuchung des Invasionsverhaltens der transfizierten BPH-1-Zellen zunächst gar nicht geplant. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse, in denen die Überexpression von V12-Rac3, C1199 und FL-Tiam/wt-Rac3 allerdings zu aggressiveren Phänotypen der BPH-1-Zellen führten, wurde dann doch der *Matrigel-Invasionsassay* durchgeführt. Hierbei mussten die suspendierten Zellen aktiv eine rekonstituierte Basalmembran überwinden (vgl. III.4.4). Es stellte sich heraus, dass sowohl die V12-Rac3- als auch die FL-Tiam/wt-Rac3-transfizierten Zellen im Vergleich zu den mock- bzw. mock/mock-transfizierten Kontrollzellen eindeutig eine signifikant gesteigerte Invasion aufwiesen (jeweils $p < 0,05$) (Abb. IV.12). Dagegen war das Invasionsverhalten nach Transfektion von wt-Rac3, FL-Tiam und C1199-Tiam zwar tendenziell gesteigert, dieser Effekt war allerdings in zwei von drei Versuchen nicht signifikant.

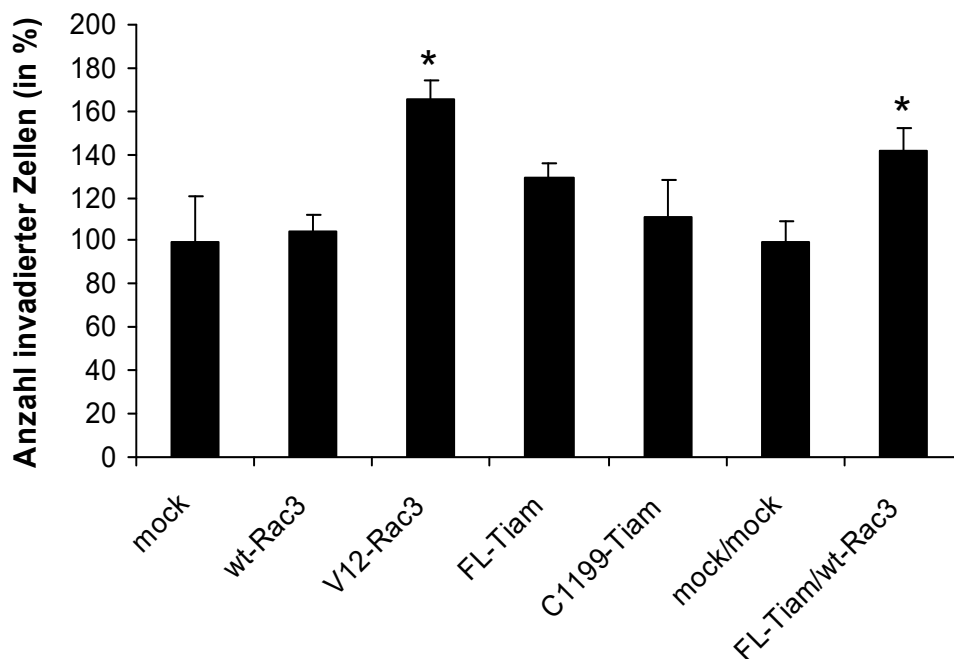


Abb. IV.12 Effekte von Rac3 und Tiam1 auf das Invasionsverhalten von BPH-1-Zellen im *Matrigel-Invasionsassay*.

Die Zellen wurden auf matrigelbeschichteten *Transwellmembranen* ausgesät. Die nach 24 Stunden invadierten Zellen wurden angefärbt und ausgezählt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils vier Messwerten eines Versuchs. Mit * markierte Säulen repräsentieren ein statistisch signifikantes Ergebnis. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ im Vergleich zum leeren Vektor (mock bzw. mock/mock) festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des nichtparametrischen doppelseitigen Mann-Whitney-Tests. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

2.7 Onkogene Transformation

Die bislang durchgeführten Untersuchungen, die sowohl die Zell-Zelladhäsion, die Zellmorphologie, die Zelladhäsion an Laminin als auch das Migrationsverhalten betrafen, ergaben, dass insbesondere die Überexpression der beiden konstitutiv aktiven Proteine V12-Rac3 und C1199-Tiam ebenso wie von FL-Tiam/wt-Rac3 zu einem aggressiveren Phänotyp führen. Allerdings wurde das Invasionspotenzial nur durch V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3 signifikant gesteigert, während für C1199 kein eindeutiger Effekt nachgewiesen werden konnte. Um auch das onkogene Potenzial von Rac3 und Tiam1 in den benignen prostatistischen BPH-1-Zellen genauer zu untersuchen, wurden daher zwei verschiedene *Transformationsassays* durchgeführt.

Im sogenannten *Soft agar assay* wurde die Fähigkeit der Zellen zur Bildung von Zellkolonien bei fehlendem Kontakt zu einem spezifischen Untergrund analysiert (Abb. IV.13). Benigne Zellen sind normalerweise nicht in der Lage, verankerungsunabhängig zu wachsen. Erst transformierte Zellen erlangen die Eigenschaft, auch dann Zellkolonien bilden zu können, wenn sie in Weichagar eingebettet sind (Wagener und Müller, 2010). Für diesen Versuch wurde eine Einzelzellsuspension in Weichagar eingegossen und im Verlauf mehrerer Wochen auf Kolonienbildung untersucht. Dabei zeigte sich eine ausgesprochen starke und relativ schnelle Kolonienbildung in V12-Rac3-transfizierten BPH-1-Zellen (Abb. IV.13 C). Auch bei der Überexpression von FL-Tiam/wt-Rac3 (Abb. IV.13 G) konnte die Bildung einzelner Kolonien nachgewiesen werden. Allerdings war der transformierende Effekt weniger stark ausgeprägt, da sich die Kolonien in ihrer Größe, ihrem zeitlichen Entstehen und insbesondere in ihrer Anzahl von denen bei V12-Rac3 unterschieden. Bei den anderen Zelllinien wie wt-Rac3, FL-Tiam und C1199 (Abb. IV.13 B, D, E) konnte dagegen ebenso wie bei den Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert waren, (Abb. IV.13 A, F) kein Kolonienwachstum nachgewiesen werden.

In einem weiteren Versuch, dem sogenannten *Colony formation assay*, wurde die Fähigkeit der Zellen zur dreidimensionalen Kolonienbildung untersucht. Im konfluenten Zustand kommt es bei benignen Zellen normalerweise zu einem Wachstumsstopp durch Dichtehemmung. Onkogen transformierte Zellen verlieren dagegen dieses kontakthemmende Wachstum und sind damit in der Lage, dreidimensionale Kolonien auszubilden (Wagener und Müller, 2010). Dazu wurden die stabil transfizierten BPH-Zellen im konfluenten Zustand in Standardzellkulturmedium kultiviert und im Phasenkontrastmikroskop beobachtet (Abb. IV.14). Während die mock- bzw. mock/mock-transfizierten Kontrollzellen (Abb. IV.14 A, F) ebenso wie C1199-Tiam-exprimierende Zellen (Abb. IV.14 E) nicht in der Lage waren, dreidimensionale Kolonien zu bilden, traten in allen anderen Zelllinien Kolonien auf.

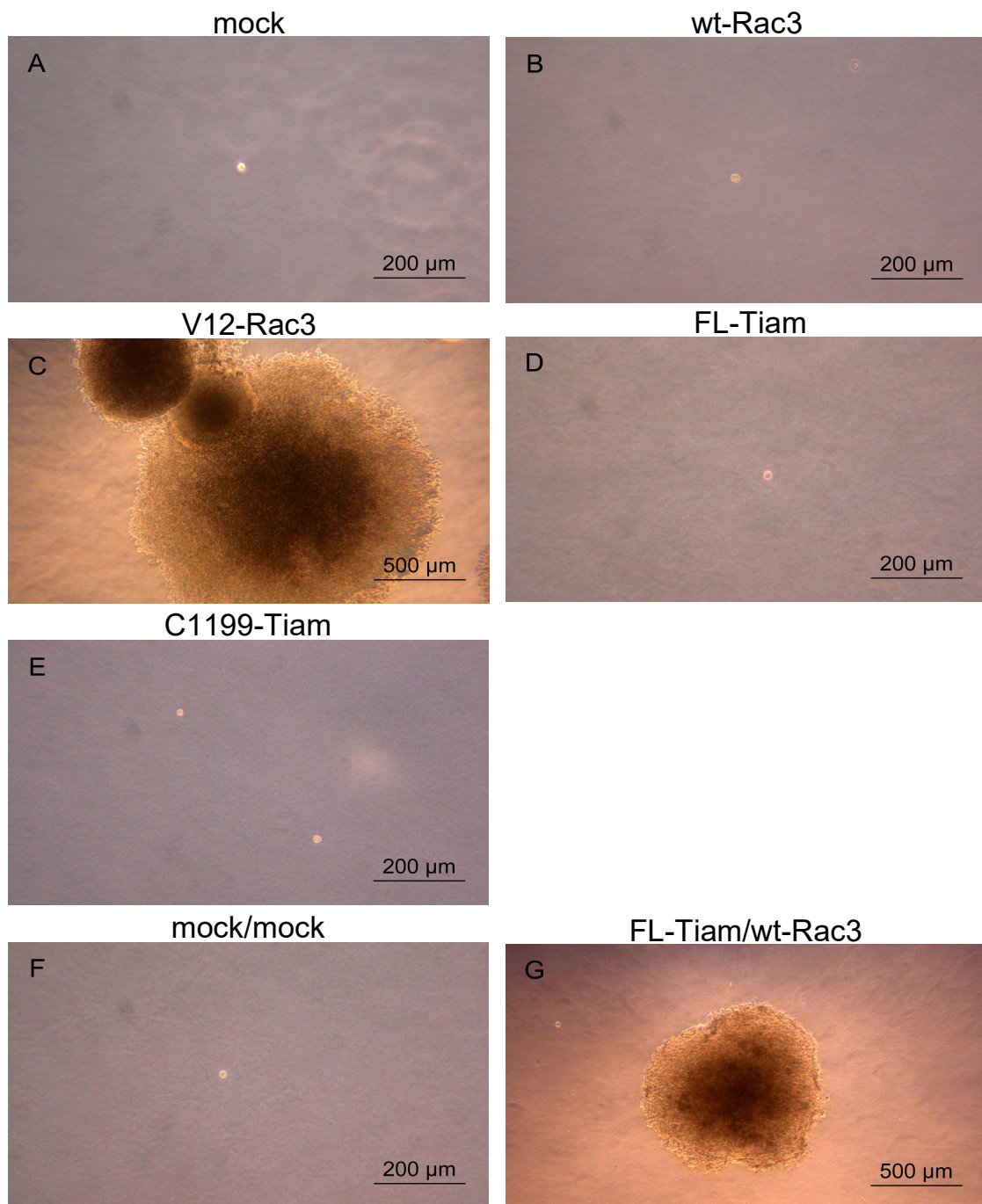


Abb. IV.13 Analyse der transformierenden Eigenschaften verschiedener Rac3- und Tiam1-Proteine in BPH-1-Zellen im *Soft agar assay*.

Es wurde jeweils die onkogene Potenz der Rac3- und Tiam1-transfizierten Zellen im Vergleich zu den mock-transfizierten Kontrollzellen als Induktion eines sogenannten verankerungsunabhängigen Wachstums untersucht. Beachtet werden muss die unterschiedliche Vergrößerung, welche anhand des Maßstabes zu erkennen ist. Die Zelllinien ohne Kolonienbildung sind also stärker vergrößert als die Zelllinien mit Kolonienbildung (wie V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

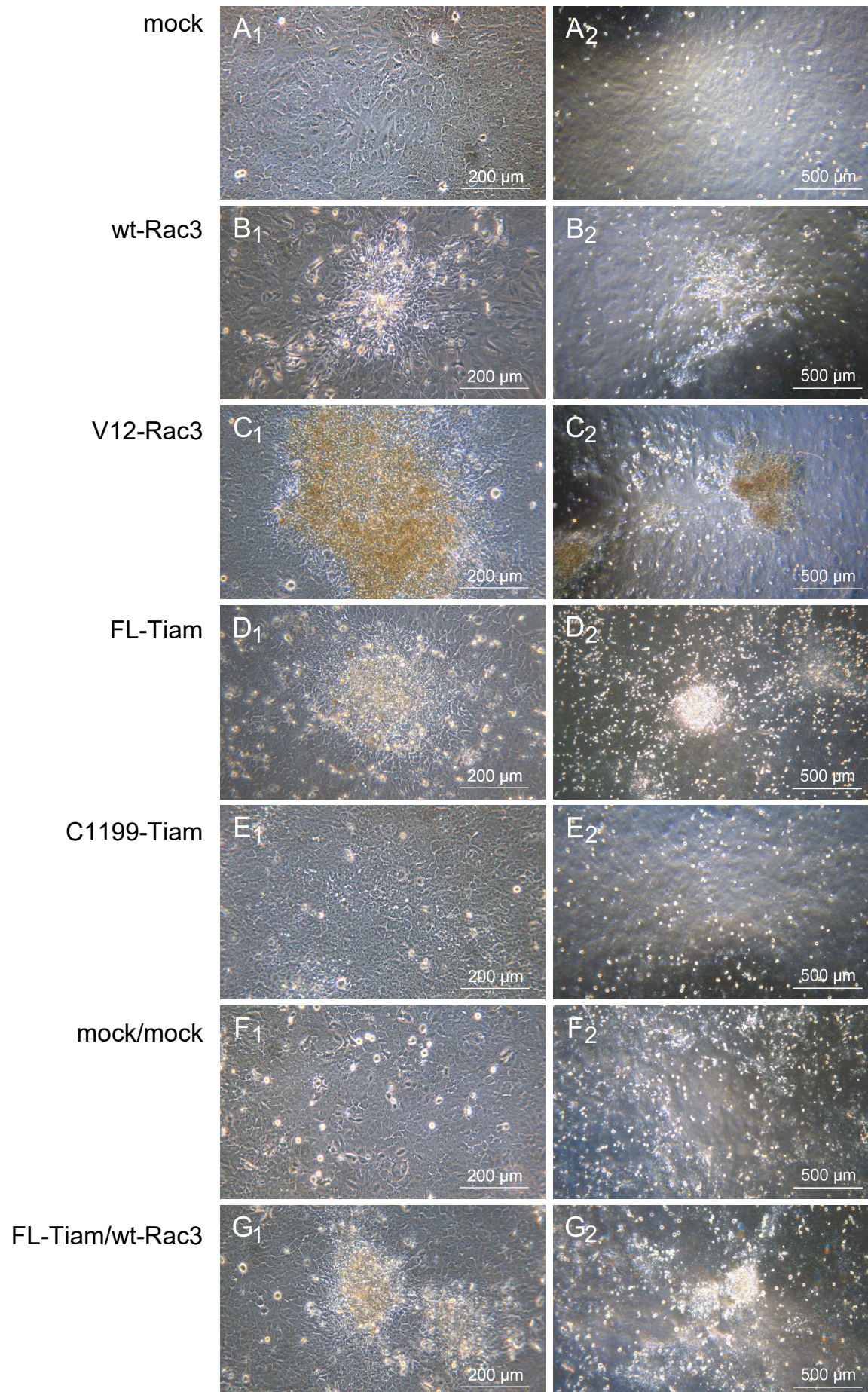


Abb. IV.14 Analyse der transformierenden Eigenschaften verschiedener Rac3- und Tiam1-Proteine in BPH-1-Zellen im *Colony formation assay*.

Die onkogene Potenz verschiedener Rac3- und Tiam1-transfizierter Zellen im Vergleich zu mock-transfizierten Kontrollzellen wurde als Ausbildung dreidimensionaler Kolonien untersucht. Beachtet werden muss die unterschiedliche Vergrößerung, welche anhand des Maßstabes zu erkennen ist. In der linken Bilderspalte (mit ₁ markierte Bilder) entspricht der Balken 200 µm, in der rechten Bilderspalte (mit ₂ markierte Bilder) 500 µm. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Insbesondere mock führte zu einer sehr regelmäßigen Einzelzellschicht. Bei C1199-Tiam wirkte diese dagegen viel unruhiger und unregelmäßiger, allerdings konnte auch hier kein eindeutiges Kolonienwachstum beobachtet werden (Abb. IV.14 E). Dagegen waren bei der Überexpression der beiden Wildtyp-Proteine wt-Rac3 (Abb. IV.14 B) und FL-Tiam (Abb. IV.14 D) sowie bei den mit FL-Tiam/wt-Rac3 ko-transfizierten Zelllinien (Abb. IV.14 G) wenige, relativ kleine, aber vergleichbare Kolonien vorhanden. Die Kolonien bei V12-Rac3 (Abb. IV.14 C) waren größer und zahlreicher.

Zusammenfassend führten nur V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3 in beiden Transformationsassays zu einer vollständigen onkogenen Transformation, während in den mit leerem Vektor transfizierten BPH-1-Zellen und den C1199-Tiam-exprimierenden Zellen kein entsprechender Effekt zu beobachten war. Wt-Rac3 und FL-Tiam führten nur im *Colony formation assay* zur onkogenen Transformation, zeigten allerdings im *Soft agar assay* keine Wirkung. Interessanterweise führten damit von den drei Zelllinien, die in den vorherigen Versuchen einen aggressiveren Phänotyp bewirkten – nämlich V12-Rac3, C1199-Tiam und FL-Tiam/wt-Rac3 – nur V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3 zur vollständigen onkogenen Transformation sowie zu einem signifikant gesteigerten Invasionsverhalten, während C1199-Tiam hierzu nicht fähig war.

V. DISKUSSION

Zur Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms tragen verschiedenste Signalwege bei, die viele komplexe genetische und epigenetische Mechanismen umfassen (Schulz und Hoffmann, 2009). Während einige in anderen Tumoren bewährte Tumorsuppressorgene und Onkogene beim Prostatakarzinom zwar verändert sind, scheinen sie dennoch keine entscheidende Rolle bei der Entstehung dieses Tumors zu spielen (Schulz et al., 2003). Im Hinblick darauf, dass das Prostatakarzinom als mittlerweile häufigster maligner Tumor bei Männern in den westlichen Ländern ein großes Gesundheitsproblem darstellt, besteht noch ein sehr großer Forschungsbedarf, um die Grundlagen dieses Tumors zu verstehen und damit bessere Möglichkeiten zur Prävention, Diagnosestellung und Therapie entwickeln zu können (Schulz et al., 2003; Statistisches-Bundesamt, 2010).

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Rac3 und Tiam1 sowohl im Prostatakarzinom als auch in der HG-PIN, der Vorläuferläsion des Prostatakarzinoms, signifikant stärker exprimiert werden als im jeweils korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel und dass diese Überexpressionen zudem einen aggressiven klinischen Verlauf vorhersagen (Engers et al., 2006a; Engers et al., 2007).

Es handelt sich bei Rac3 um eine von drei verschiedenen Isoformen der Rho-ähnlichen GTPase Rac, wobei im Gegensatz zu Rac1 über die funktionelle Bedeutung von Rac3 noch sehr wenig bekannt ist. Rac-Proteine spielen ebenso wie der Rac-spezifische Aktivator Tiam1 eine wichtige Rolle bei der onkogenen Transformation, der Tumordinvasion sowie der Metastasierung (Baugher et al., 2005; Engers et al., 2001; Hordijk et al., 1997; Sander et al., 1998). Da in früheren Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsleveln von Rac3 und Tiam1 zwischen Prostatakarzinomen und prämaligen HG-PIN-Läsionen festgestellt werden konnten, scheint die Überexpression dieser Proteine schon frühzeitig in der Entstehung des Prostatakarzinoms aufzutreten (Engers et al., 2006a; Engers et al., 2007). Die signifikante Korrelation der gesteigerten Expression von Rac3 und seinem Aktivator Tiam1 im untersuchten Gewebe deutet zudem darauf hin, dass in Prostatakarzinomen nicht nur eine erhöhte Rac-Expression, sondern wahrscheinlich auch eine erhöhte Rac-Aktivität vorhanden sein dürfte (Engers et al., 2007). Aufgrund dieser Ergebnisse sowie unter Beachtung des transformierenden Potenzials von Rac3 und Tiam1 in anderen Zelllinien (Engers und Gabbert, 2000; Joyce und Cox, 2003; Keller et al., 2005) könnte der Tiam1/Rac3-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Prostatakarzinogenese spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher erstmals die funktionelle Bedeutung der Rho-ähnlichen GTPase Rac3 und des Rac-spezifischen Aktivators Tiam1 für die Entstehung des Prostatakarzinoms untersucht.

1 Modellsystem

Als Modellsystem für diese Untersuchungen wurden benigne Prostataepithelzellen, sog. BPH-1-Zellen, verwendet. Diese wurden mithilfe von FuGENE 6 stabil mit verschiedenen Rac3- und Tiam1-Konstrukten transfiziert, und zwar zunächst mit der Vektorkontrolle (pLZRS-Bsd = mock), wt-Rac3, V12-Rac3, FL-Tiam und C1199-Tiam.

Bei FL-Tiam und wt-Rac3 handelt es sich um die beiden ursprünglichen Wildtyp-Proteine, deren Überexpression nicht nur in Prostatakarzinomen, sondern auch in verschiedensten anderen Tumoren nachgewiesen werden konnte (Engers et al., 2006a; Fritz et al., 1999; Liu et al., 2005; Pan et al., 2004).

C1199-Tiam ist im Vergleich zu FL-Tiam ein N-terminal *trunkiertes* Konstrukt. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit benutzt, da es stabiler als FL-Tiam ist (Engers et al., 2001).

Bei dem Protein V12-Rac3 ist an Position 12 Glycin gegen Valin ausgetauscht. Diese Mutation vermindert die intrinsische GTPase-Aktivität von Rac und macht das Protein unempfindlich gegenüber GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs). Dadurch wird der Rac3-Signalweg in den betreffenden Zellen konstitutiv aktiviert (Haataja et al., 1997; Ridley et al., 1992). Da *in vivo* bislang allerdings keine aktivierenden Mutationen in Genen, die für Rho-ähnliche Proteine kodieren, gefunden werden konnten (Joyce und Cox, 2003; Mertens et al., 2003b), war der direkte Transfer der Ergebnisse im Verlauf dieser Arbeit auf die Verhältnisse *in vivo* nur begrenzt möglich. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass Rac-Proteine *in vivo* durch die Überexpression ihrer Wildtyp-Form bzw. durch Hyperaktivierung durch ihre Regulatoren, wie z. B. durch den GEF Tiam1, zur malignen Transformation beitragen können (Joyce und Cox, 2003; Mertens et al., 2003b). Auch im Vorfeld dieser Arbeit war eine starke Korrelation der Überexpression von Tiam1 und Rac3 in Prostatakarzinomen festgestellt worden (Engers et al., 2007). Um diese Möglichkeit einer Hyperaktivierung des Rac3-Signalwegs im Modellsystem auch im Rahmen dieser Arbeit zu imitieren und damit genauere Aussagen über die funktionelle Relevanz von Rac3 und Tiam1 für die Entstehung des Prostatakarzinoms machen zu können, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit BPH-1-Zellen auch mit den beiden Wildtyp-Proteinen FL-Tiam und wt-Rac3 (FL-Tiam/wt-Rac3) bzw. mit den beiden Vektorkontrollen (pLZRS-Zeo/pLZRS-Bsd; mock/mock) ko-transfiziert.

Nachdem die Überexpression der verschiedenen Rac3- und Tiam1-Konstrukte nach der stabilen Transfektion in den BPH-1-Zellen durch Western Blots nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. IV.1), wurde mithilfe des *Rac-Aktivitätsassays* die Aktivität von Rac in diesen Zellen analysiert. Erwartungsgemäß konnte gezeigt werden, dass das meiste aktive Flag-markierte Rac3 in den mit konstitutiv aktivem V12-Rac3-transfizierten Zellen vorhanden war, während

die mit FL-Tiam/wt-Rac3 ko-transfizierten Zellen weniger aktives Flag-Rac3 aufwiesen (vgl. Abb. IV.2). Im Gegensatz dazu war kaum aktives Rac3 in den wt-Rac3-exprimierenden Zellen vorhanden. Dies belegt, dass Rac3 in den BPH-1-Zellen durch den Rac-spezifischen Aktivator Tiam1 aktiviert wird, da FL-Tiam/wt-Rac3 mehr aktives Rac3 als wt-Rac3 enthielt. Während in den mock-transfizierten BPH-1-Zellen kein endogenes Rac detektierbar war, konnte bei FL-Tiam und C1199-Tiam wenig aktives endogenes Rac nachgewiesen werden. Das endogene Rac konnte aufgrund des benutzten Antikörpers jedoch nicht in Rac1 bzw. Rac3 differenziert werden.

Insgesamt war es unerwartet, dass das aktive C1199-Tiam insgesamt nur zu so einer schwachen Aktivierung von Rac (Rac1 und Rac3) führte. In anderen Zelllinien, wie humanen clearCa-28 Nierenzellkarzinomzellen oder Cos7-Zellen konnte stattdessen eine vergleichsweise starke Aktivierung von Rac durch C1199-Tiam im *Rac*-Assay nachgewiesen werden (Engers, 2001; Herbrand, 2003). Der Grund für die relativ schwache Rac-Aktivierung durch C1199-Tiam in den BPH-1-Zellen ist, dass C1199-Tiam nur endogen vorhandenes Rac aktivieren kann. Das Ergebnis zeigt, dass in BPH-1-Zellen damit deutlich weniger endogenes Rac vorhanden ist als in anderen Zelllinien bzw. nach Transfektion mit V12-Rac3 oder FL-Tiam/wt-Rac3.

2 Effekte von Rac3 und Tiam1 in funktionellen Untersuchungen

Die Initiation und Progression maligner Tumore schließt eine Reihe kumulativer, molekularer Veränderungen ein, die mit der Zellproliferation, der Transformation, der Zelladhäsion sowie der Migration assoziiert sind (Mareel und Leroy, 2003; Sun et al., 2006). Um die funktionelle Bedeutung von Rac3 und Tiam1 für die Entstehung des Prostatakarzinoms zu untersuchen, wurden daher diverse zellbiologische Funktionsuntersuchungen mit den transfizierten BPH-1-Zellen durchgeführt. Diese dienten zum einen dazu, Aussagen über die Erlangung von Eigenschaften, die einen aggressiven Phänotyp definieren, zu machen. Dazu gehörten beispielsweise die Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit, der Zell-Zelladhäsion, der Zellmorphologie, der Zell-Substratadhäsion an Laminin sowie des Migrations- und Invasionsverhaltens. Zum anderen sollte das onkogene Potenzial von Rac3 und Tiam1 in den benignen Prostataepithelzellen *in vitro* untersucht werden, da Tumorzellen durch autonomes Wachstum geprägt sind, das zu einem Verlust der Kontaktinhibition und der Wachstumskontrolle durch den Zellverband sowie zum Verlust des verankerungsabhängigen Wachstums führt (Wagener und Müller, 2010).

2.1 Effekte auf die Proliferation

Bei der Untersuchung der funktionellen Bedeutung von Rac3 und Tiam1 auf die Proliferation der benignen Prostataepithelzelllinie BPH-1 im XTT-Test konnte gezeigt werden, dass alle Zelllinien einen annähernd sigmoidalen Verlauf der Wachstumskurven aufweisen (vgl. Abb. IV.3). Es kommen verschiedene Ursachen für das Auftreten einer Sättigung aller Zelllinien gegen Ende des Versuchs in Betracht. Der wahrscheinlichste und einfachste Grund jedoch ist, dass die Zellen auf der begrenzt zur Verfügung stehenden Wachstumsfläche Konfluenz erreichten und dadurch ihr Wachstum verlangsamten. Möglich wäre allerdings auch, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt die im Medium vorhandenen Wachstumsfaktoren aufgebraucht haben.

Es konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass die Überexpression von C1199-Tiam, FL-Tiam sowie des konstitutiv aktiven V12-Rac3 zu einer deutlich verminderten Sättigungsdichte der BPH-1-Zellen im Vergleich zu den mock-transfizierten Kontrollzellen führt. Diese reduzierte Sättigungsdichte lässt sich durch eine deutliche Veränderung des Phänotyps der BPH-1-Zellen erklären. Wie bei der späteren Betrachtung der Zellmorphologie und der Zell-Zelladhäsion erkennbar war, wurden die Zellen bei Überexpression dieser Proteine schließlich sehr stark in ihrer Zellgröße und dem Wachstumsmuster beeinflusst. So führte

C1199-Tiam zu einem stark dissoziierten Wachstum. FL-Tiam beeinflusste die Zellen dagegen hinsichtlich eines noch epithelialeren Phänotyps als mock und V12-Rac3 bewirkte nicht nur ein lockereres Wachstumsmuster, sondern erhöhte an sich auch sehr stark die Zellgröße. Die signifikant verminderte Sättigungsdichte dieser Zellen im Vergleich zu mock (vgl. Abb. IV.4B) lässt sich damit erklären, dass sie für ihr Wachstum einfach mehr Platz beanspruchten, dadurch schon bei einer geringeren Zellzahl konfluent wurden und aufgrund der Kontaktinhibition schließlich das Wachstum hemmten.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das aktive C1199-Tiam im XTT-Test jedoch nicht nur zu einer verminderten Sättigungsdichte führte, sondern auch eine signifikante Proliferationshemmung im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Kontrollzellen bewirkte (vgl. Abb. IV.4A). Dieses Ergebnis war insofern auffällig, da C1199-Tiam damit als einzige Zelllinie eindeutig langsamer als die Kontrolle wuchs. Auch für FL-Tiam konnte gezeigt werden, dass die maximale Proliferationsaktivität im Vergleich zu mock tendenziell niedriger war, wenn auch kein signifikanter Unterschied bestand. Dieses Ergebnis deutet daher darauf hin, dass Tiam1 in benignen prostaticen Epithelzellen zu einer Proliferationshemmung führt. Allerdings stimmt es nicht mit Untersuchungen an metastasierenden Melanomzellen überein, in denen die Überexpression von Tiam1 die Proliferation signifikant steigerte (Uhlenbrock et al., 2004). Passend dazu führte auch der *Knockdown* von Tiam1 in einer kolorektalen Tumorzelllinie durch RNA-Interferenz zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums *in vitro* (Liu et al., 2006). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass Tiam1-bedingte Effekte auf die Proliferation zelltypabhängig sind.

Obwohl V12-Rac3-transfizierte Zellen nach der Zellaussaat zunächst schneller als die Kontrollzellen proliferierten, unterschieden sich diese beiden Zelllinien nicht signifikant in der maximalen Proliferationsaktivität (vgl. Abb. IV.4A). Auffällig war jedoch, dass sich die maximale Proliferationsaktivität zwar nicht in den absoluten Werten unterschied, dass diese aber bei V12-Rac3 (2.-3. Tag) früher als bei den Kontrollzellen (3.-4. Tag) erreicht wurde.

Bei Betrachtung der Wachstumskurven wird offensichtlich, dass das frühe Erreichen der Sättigungsdichte von V12-Rac3 (vgl. Abb. IV.4B) das Proliferationsverhalten möglicherweise beeinflussen könnte. Es konnte trotz Durchführung zweier verschiedener Versuche (XTT-Test und Zellzählung) (vgl. Abb. IV.3 und Abb. IV.5) zwar keine signifikante Proliferationssteigerung durch V12-Rac3 in wiederholten Versuchen nachgewiesen werden, allerdings kann diese durch das frühe Erreichen der Sättigung auch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Auch wt-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3 führten zu keiner signifikanten Beeinflussung der Proliferation im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrolle (vgl. Abb. IV.3).

Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen an verschiedenen Zelltypen überein, in denen gezeigt werden konnte, dass Rac-GTPasen die Proliferation in Abhängigkeit vom Zelltyp und vom Aktivierungsstatus unterschiedlich beeinflussen können. So führte die siRNA-bedingte Depletion sowohl von Rac1 als auch von Rac3 zwar nur zu einer geringgradigen, allerdings reproduzierbaren Hemmung des Zellwachstums in der Glioblastomzelllinie SNB19 (Chan et al., 2005). Ein ähnlich geringer Effekt auf die Zellproliferation konnte in der humanen Mammakarzinomzelllinie BT549 durch Depletion von Rac1 festgestellt werden, während eine Rac3-Depletion im Grunde keinen Effekt auf die Proliferation dieser Zellen hatte (Chan et al., 2005). Im Gegensatz dazu wiesen Mira et al. (1999) das Vorhandensein von hyperaktivem Rac3 in stark proliferativen Mammakarzinomzelllinien (MDA-MB 435, T47D und MCF 7) nach, während in normalen bzw. weniger proliferativen Mammakarzinomzelllinien kein hyperaktives Rac3 festgestellt werden konnte. Es zeigte sich dabei, dass das aktive Rac3 eine entscheidende Rolle für die DNA-Synthese in diesen Zellen spielte.

Zusammengefasst ließ sich in dieser Arbeit kein nennenswerter Effekt von Rac3 auf die Proliferation von BPH-1-Zellen nachweisen, was eine zelltypabhängige Beeinflussung der Proliferation durch Rac3 bestätigt.

2.2 Effekte auf die Zell-Zelladhäsion und den Phänotyp

Der klinische Verlauf sowie die Prognose maligner Tumorerkrankungen hängt insbesondere von der Fähigkeit der Tumorzellen zur Invasion und Metastasenbildung ab. Dabei stellt die Tumorzelldissoziation mit der Auflösung von Zell-Zellkontakten eine Voraussetzung für die Invasion des Wirtsgewebes dar (Engers und Gabbert, 2000).

Es ist bekannt, dass Rac-Proteine als Hauptregulatoren des Aktinzytoskeletts spezifisch die Lamellipodienbildung und das *membrane ruffling* sowie die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zelladhäsion, die Migration und die Tumorzellinvasion beeinflussen (Baugher et al., 2005; Engers et al., 2001; Hall, 1998; Hordijk et al., 1997; Keely et al., 1997; Kuroda et al., 1998; Sander et al., 1998). Allerdings ist besonders der Einfluss auf die Invasion und Migration sehr stark vom Zelltyp und dem Zellsubstrat abhängig, da der Tiam1/Rac-Signalweg in epithelialen Zellen die Ausbildung der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion fördert und damit die Invasion wiederum hemmt (Hordijk et al., 1997; Sander et al., 1998).

Die Untersuchung der mit Rac3- und Tiam1-transfizierten Zellen im Phasenkontrastmikroskop (vgl. Abb. IV.6) sowie nach immunzytologischer Färbung mit Phalloidin im Laser-Scanning-Immunfluoreszenzmikroskop (vgl. Abb. IV.7) sollte Einblicke in die genauere Funktion der beiden Proteine im Hinblick auf eine Veränderung der Zell-Zelladhäsion und des Phänotyps in den Prostataepithelzellen geben.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des konstitutiv aktiven V12-Rac3 zu einem viel lockereren, nicht so kompakten Wachstumsmuster führt, während die mock-transfizierten Kontrollzellen in ganz kompakten Zellverbänden wuchsen. Dies deutet auf eine Hemmung der Zell-Zelladhäsion mit gesteigerter Mobilität durch Rac3 in den BPH-1-Zellen hin, obwohl es sich hierbei eigentlich um Zellen epithelialen Ursprungs handelt. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnte in früheren Untersuchungen an epithelialen Zellen häufig gezeigt werden, dass der Tiam1-Rac-Signalweg die Ausbildung der Zell-Zelladhäsion fördert und nicht hemmt (Hordijk et al., 1997). Allerdings wurden diese Untersuchungen erstens auch nicht speziell mit Rac3, sondern mit Rac1 und zweitens nicht mit Prostataepithelzellen durchgeführt.

Bestätigt wurde dieses zell-zelladhäsionshemmende Verhalten durch V12-Rac3 in den BPH-1-Zellen bei Betrachtung der veränderten Zell-Zellkontakte, die im Phasenkontrastmikroskop wesentlich weniger intensiv als bei mock-transfizierten Zellen erschienen (vgl. Abb. IV.6). Bei Färbung der Zellen mit Phalloidin stellte sich als Grund dafür heraus, dass sehr oft richtige Spalten zwischen benachbarten Zellen klafften und damit die verminderte Zell-Zelladhäsion durch V12-Rac3 bestätigten (vgl. Abb. IV.7 D).

Auch die Überexpression von FL-Tiam/wt-Rac führte zu lockereren, nicht so gut abgegrenzten Zellverbänden mit weniger intensiven Zell-Zellkontakten im Vergleich zu mock/mock-transfizierten Zellen (vgl. Abb. IV.6). Allerdings war dieses Verhalten nicht ganz so stark ausgeprägt wie bei V12-Rac3-exprimierenden Zellen. Im Gegensatz dazu wiesen wt-Rac3-transfizierte Zellen, welche kaum aktives Rac3 enthielten, keinen großen Unterschied im Wachstumsmuster im Vergleich zu mock-transfizierten Zellen auf (vgl. Abb. IV.6).

Da in FL-Tiam/wt-Rac3-transfizierten Zellen weniger aktives Rac3 als bei V12-Rac3-transfizierten Zellen, aber mehr als bei wt-Rac3-exprimierenden Zellen vorhanden war, zeigt dies, dass Rac3 in BPH-1-Zellen in Abhängigkeit von seinem Aktivierungsstatus die Zell-Zelladhäsion unterschiedlich stark hemmt und deutet zudem darauf hin, dass Effekte von Tiam1 durch Rac3 vermittelt werden können.

Auch die BPH-1-Zellen mit Überexpression des stabileren C1199-Tiams führten im Vergleich zu den mock-transfizierten Kontrollzellen zu einem dissoziierteren Wachstumsmuster, was ebenfalls auf eine Hemmung der Zell-Zelladhäsion durch Tiam1 hinweist (vgl. Abb. IV.6). Dies passt zu den Untersuchungen von Minard et al. (2006), in denen eine Überexpression von Tiam1 in humanen Kolonkarzinomzellen die Zelladhäsion verringerte. Die Überexpression von FL-Tiam in BPH-1-Zellen dagegen führte zu ganz kompakten Zellverbänden, die wiederum mit mock vergleichbar waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass nicht nur aktives Rac3, sondern auch aktives Tiam1 zu einer Hemmung der Zell-Zelladhäsion in BPH-1-Zellen führt

und damit eine wichtige Voraussetzung für eine Tumorzellinvasion bei der Entstehung des Prostatakarzinoms schafft.

Auch der Phänotyp kann wichtige Hinweise auf ein metastasenbildendes Verhalten von Zellen geben. So stellen Zellausstülpungen, wie zum Beispiel Lamellipodien oder *membrane ruffles*, eine Voraussetzung für den Prozess der Zellmigration dar, indem sie mit der extrazellulären Matrix interagieren (Friedl und Wolf, 2003).

Als *membrane ruffling* wird das gekräuselte Aussehen der Plasmamembran bezeichnet, welches durch kleine, dynamische Membranprotrusionen, die Aktinfilamente enthalten, hervorgerufen wird. Diese können sich entweder wieder einziehen oder aber auch zum Lamellipodienwachstum beitragen (Friedl und Wolf, 2003). Bei Lamellipodien handelt es sich um ganz flache, breite Zellvorstülpungen der Plasmamembran, die durch ein breites, orthogonal quervernetztes Aktinengeflecht entstehen (Friedl und Wolf, 2003; Mitchison und Cramer, 1996). Lamellipodien bilden schwache Anhaftungsstellen an das Substrat aus, die als fokale Komplexe bzw. Adhäsionen bezeichnet werden (Nobes und Hall, 1999). Diese Zellausstülpungen haben sich nicht nur als wichtige Struktur in der zellulären Migration erwiesen, sondern sie spielen auch eine bedeutende Rolle in der Tumordinvasion (Baugher et al., 2005; Friedl und Wolf, 2003). Auf molekularer Ebene sind insbesondere Rac-Proteine für die Ausbildung von Lamellipodien und *membrane ruffles* verantwortlich (Hall, 1998). So konnten Baugher et al. (2005) eine direkte Korrelation zwischen einer starken Rac-induzierten Lamellipodienexpression und einer gesteigerten Metastasierung nachweisen. Zellen mit starkem *membrane ruffling* oder ausgeprägter Lamellipodienexpression werden daher häufig als invasiven Phänotyp beschrieben (Baugher et al., 2005; Schmitz et al., 2000).

Aus diesem Grunde wurden auch in dieser Arbeit die Phänotypen der Rac3- und Tiam1-exprimierenden BPH-1-Zellen untersucht (vgl. Abb. IV.6). Hierbei wiesen die mit Leervektor-transfizierten Kontrollzellen (mock bzw. mock/mock) einen überwiegend epithelialen, vereinzelt aber auch angedeutet spindeligen Phänotyp auf. Die peripheren Zellgrenzen waren gut erkennbar und es war kein *membrane ruffling* vorhanden.

Während wt-Rac3 keinen großen Unterschied zu mock erkennen ließ, bewirkte die Überexpression von konstitutiv aktivem V12-Rac3 dagegen einen auffallend anderen Phänotyp (vgl. Abb. IV.6 und Abb. IV.7). Die Zellen erschienen wesentlich größer, abgeflachter und zeigten ein ausgeprägtes *membrane ruffling*, wodurch eine typische „pfannkuchenartige“ Morphologie entstand (Michiels et al., 1995). Das *ruffling* war dabei relativ schwer im Phasenkontrastmikroskop zu erkennen, da sich die peripheren Zellgrenzen kaum vom

Zellkulturflaschenboden abhoben. Das *ruffling* deutet auf einen aggressiven Phänotyp mit gesteigertem Migrations- und Invasionspotenzial hin.

So sind diese Ergebnisse übereinstimmend mit Untersuchungen an verschiedenen Varianten einer metastasierten Mammakarzinomzelllinie (Baugher et al., 2005). Die Zellen der am stärksten metastasierenden Variante enthielten dabei wesentlich mehr aktives Rac als die Zellen der anderen Varianten und induzierten dadurch eine viel größere Lamellipodien-expression. Außerdem waren diese Zellen signifikant größer als ihre Varianten und wiesen mehr fokale Adhäsionen pro Zellfläche auf. Die Korrelation zwischen der Lamellipodienbildung, der Anzahl der fokalen Adhäsionen und des Metastasierungspotenzials dieser Zellvarianten ergab, dass ein verstärkt migrierender und invasiver Phänotyp höchstwahrscheinlich mit einer erhöhten Metastasierung korreliert (Baugher et al., 2005). Da die V12-Rac3-exprimierenden BPH-1-Zellen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls zu einem ausgeprägten *membrane ruffling* führten und die Zellen auch wesentlich größer als die mock-transfizierten Kontrollzellen waren, deutet dieser Rac3-induzierte Phänotyp insgesamt auf ein gesteigertes Invasions- und Migrationspotenzial hin.

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis führten die FL-Tiam/wt-Rac3-exprimierenden Zellen, in denen etwas weniger aktives Rac3 als bei V12-Rac3-transfizierten Zellen vorhanden war, zu einem ähnlichen Phänotyp wie V12-Rac3 (vgl. Abb. IV.6).

Die FL-Tiam-exprimierenden Zellen erschienen durch die polygonale, pflastersteinartige Anordnung noch epithelialer als die mock-transfizierten Zellen (vgl. Abb. IV.6). Dieser Effekt ist typisch für Tiam1, wenn auch nur relativ wenig *ruffling* induziert wurde. Dieser Phänotyp hätte theoretisch bei dem aktiveren C1199-Tiam ausgeprägter vorhanden sein müssen. Überraschend war jedoch, dass die Zellen kleiner und spindeliger als bei V12-Rac3 wirkten (vgl. Abb. IV.6). Insgesamt war *membrane ruffling* vorhanden, allerdings in einem geringeren Maße als beim konstitutiv aktiven V12-Rac3 oder auch als bei FL-Tiam/wt-Rac3. Dies könnte darauf hinweisen, dass in BPH-1-Zellen relativ wenig endogenes Rac3 vorhanden ist.

Insgesamt kann nach Betrachtung der Wachstumsmuster als auch der Morphologien der einzelnen Zellen festgehalten werden, dass aktives Rac3 und Tiam1 einen aggressiven Phänotyp in den BPH-1-Zellen induzierten und Rac3 die Effekte von Tiam1 vermitteln kann.

2.3 Effekte auf die Zell-Substratadhäsion an Laminin

Bei dem komplexen Prozess der Tumordinvasion spielt nicht nur eine Verringerung der Zell-Zelladhäsion, sondern auch die Ausbildung räumlich und zeitlich begrenzter Zell-Substratkontakte eine wichtige Rolle (Engers und Gabbert, 2000).

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der Einfluss von Rac3 und Tiam1 auf die Zelladhäsion an Laminin untersucht (Abb. IV.8). Dabei konnte gezeigt werden, dass die beiden Wildtyp-Proteine wt-Rac3 ($p=0,004$) und FL-Tiam ($p<0,001$) zu einer gesteigerten Zelladhäsion an Laminin führen. Für die aktiven Proteine V12-Rac3, FL-Tiam/wt-Rac3 und C1199-Tiam, stellte sich dagegen heraus, dass sie die Zelladhäsion an Laminin signifikant hemmen ($p<0,001$). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die BPH-1-Zellen nicht mehr so stark in der umgebenden Matrix verhaftet sind und sich daher möglicherweise besser bewegen können.

Sander et al. (1998) konnten zeigen, dass die Tiam1/Rac-induzierte Zellantwort in V12-Ras-transformierten MDCK-f3-Zellen insbesondere vom Zellsubstrat abhängt. Während der Tiam1/Rac-Signalweg auf Fibronectin und Laminin1 die Migration durch Wiederherstellung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zelladhäsion hemmt, vermitteln Tiam1 und V12-Rac auf Kollagenen ein bewegliches Zellverhalten unter der Voraussetzung, dass die Bildung von E-Cadherin-Adhäsionen verhindert wird (Sander et al., 1998). Des Weiteren besitzt der Rac-spezifische Aktivator Tiam1 in Keratinozyten eine entscheidende Funktion in der $\alpha 3 \beta 1$ -integrin-vermittelten Aktivierung von Rac, welche für die Bildung und Sekretion von Laminin5 notwendig ist. Dieses wiederum ist unter anderem für die Ausbreitung und Migration von Keratinozyten erforderlich (Hamelers et al., 2005).

Für die Interaktion von Komponenten der EZM wie Laminin, Fibronectin und Kollagen mit inneren Zellstrukturen sind hauptsächlich Integrine, eine Familie substratspezifischer Zelloberflächenrezeptoren, verantwortlich (Engers und Gabbert, 2000; Friedl und Wolf, 2003; Giancotti und Ruoslahti, 1999; Ziober et al., 1996). Insbesondere die Familie der kleinen Rho-ähnlichen GTPasen spielt eine wichtige Rolle in der nachgeschalteten Signalübertragung vieler Wachstumsfaktorrezeptoren und Adhäsionsmoleküle, beispielsweise auch von Integrinen (Hamelers et al., 2005).

Hinweise für die Beteiligung von Integrinen an der Tumorprogression und Metastasierung konnten sowohl in *in-vivo*- als auch *in-vitro*-Studien gefunden werden. Dabei scheinen die beobachteten Ergebnisse sich teilweise zu widersprechen als auch integrin- und tumortyp-spezifisch zu sein (Engers und Gabbert, 2000). Trotz der heterogenen Ergebnisse konnte in immunhistochemischen Färbungen verschiedener Tumore jedoch wiederholt eine reduzierte Expression oder veränderte Verteilung von Laminin- und Kollagenrezeptoren festgestellt

werden (Engers und Gabbert, 2000; Gui et al., 1996; Shaw et al., 1997; Stallmach et al., 1992; Weinel et al., 1995). Da diese Rezeptoren normalerweise wichtig für die Anheftung und Stabilisation epithelialer Zellen an die Basalmembran sind, scheint eine veränderte Expression und Funktion spezifischer Integrine entscheidende Bedeutung für die Entstehung invasiver Tumoren zu haben (Engers und Gabbert, 2000; Shaw et al., 1997). So konnte in Kolonkarzinomzellen gezeigt werden, dass die integrin-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase und nachfolgend die Aktivierung von Rac für die Induktion der Invasionsfähigkeit dieser Zellen verantwortlich ist (Shaw et al., 1997).

Die Ursache dafür, dass aktives Rac3 und Tiam1 in den benignen Prostataepithelzellen zu einer Hemmung der Zell-Substratadhäsion an Laminin führten, könnte daher analog eine reduzierte Expression, eine abnormale Verteilung oder eine Inaktivierung von Integrinen sein. So konnten Hajdo-Milasinovic et al. (2007) tatsächlich defekte integrinvermittelte Zell-Matrix-adhäsionen in Rac3-exprimierenden Neuroblastomzellen nachweisen, die erst durch die forcierte Aktivierung von Integrinen wieder hergestellt werden konnten.

Die Ergebnisse von Sander et al. (1998) lassen vermuten, dass nicht nur die Rac-Aktivität an sich, sondern auch die intrazelluläre Lokalisation des Rac-Signal-Komplexes für gegensätzliche Effekte auf die Substratadhäsion epithelialer Zellen verantwortlich sind (Sander et al., 1998). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass FL-Tiam und wt-Rac3 im Gegensatz zu den aktiven Formen zu einer gesteigerten Zelladhäsion an Laminin führen.

Eine verminderte Zell-Substratadhäsion an sich stellt in Anbetracht der zuvor genannten Ergebnisse einen weiteren Hinweis auf einen aggressiven Phänotyp dar. Bei Betrachtung der Effekte von Rac3 und Tiam1 auf die Zell-Substratadhäsion (vgl. Abb. IV.8), auf die Zell-Zelladhäsion sowie auf den Phänotyp (vgl. Abb. IV.6 und Abb. IV.7) von BPH-1-Zellen fällt auf, dass die Hemmung der Zelladhäsion an Laminin mit einer verminderten Zell-Zelladhäsion und der Induktion eines aggressiven Phänotyps korreliert. Dies zeigt, dass sowohl aktives Rac3 – in Form von V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3 – als auch C1199-Tiam1 wichtige Voraussetzungen für eine Tumordinvasion in Prostataepithelzellen schaffen.

2.4 Effekte auf die Migration

Auch die aktive Migration von Zellen stellt eine Grundvoraussetzung für die Tumordinvasion dar. Die treibende Kraft für die Bewegung von Zellen kommt dabei durch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts zustande, was auf molekularer Ebene insbesondere durch die kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 vermittelt wird (Nobes und Hall, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass wt-Rac3, konstitutiv aktives V12-Rac3 und C1199-Tiam ebenso wie FL-Tiam/wt-Rac3 zu einer signifikant gesteigerten Migration der

BPH-1-Zellen im *Transwell*assay im Vergleich zu den mit Leervektor-transfizierten Kontrollzellen führen (vgl. Abb. IV.9). Die Überexpression von FL-Tiam wies dagegen nur eine tendenziell gesteigerte, statistisch aber nicht signifikante Migration auf. Mithilfe des *Scratch* assays konnte die signifikant gesteigerte Migration exemplarisch für wt-Rac3 und V12-Rac3 nochmals bestätigt werden (vgl. Abb. IV.10 und Abb. IV.11).

Bei Betrachtung dieser Ergebnisse fällt auf, dass insbesondere die BPH-1-Zellen verstärkt migrieren, die auch ein ausgeprägtes *membrane ruffling* sowie eine reduzierte Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion aufweisen, nämlich V12-Rac3, FL-Tiam/wt-Rac3 und C1199.

V12-Rac3, bei dem ein viel stärkeres *ruffling* als bei C1199-Tiam vorhanden war, führte außerdem auch zu einer vergleichsweise stärkeren Migration in zwei von drei durchgeführten Versuchen. Dieser direkte Vergleich zwischen den Zelllinien war für FL-Tiam/wt-Rac3 nicht möglich, da sich diese Zellen durch die Ko-Transfektion auf andere Kontrollzellen bezogen (nämlich mock/mock anstatt mock).

Diese Ergebnisse stimmen mit verschiedenen Untersuchungen überein. So wird aktives Rac als essenziell für die Zellmigration angesehen, da es die Aktinpolymerisation und die Anordnung von Integrin-Adhäsionskomplexen in der Zellperipherie induziert und dadurch zur Ausbildung von Membranprotrusionen führt (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Nobes und Hall, 1999). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen führte auch die siRNA-bedingte Depletion von Rac3 zu einer Hemmung der Migration in einer Glioblastomzelllinie (Chan et al., 2005). Ebenso ist auch für Tiam1 als Rac-spezifischen Aktivator bekannt, dass es die Migration beeinflussen kann. Ob Tiam1 allerdings fördernd oder hemmend auf die Migration wirkt, scheint vom Zelltyp und dem untersuchten Substrat abzuhängen (Minard et al., 2006; Sander et al., 1998). So ist Tiam1 beispielsweise wichtig für die Förderung der neuronalen Zellmigration (Ehler et al., 1997; Minard et al., 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von Tiam1 die Migration kolorektaler Karzinomzellen und die von Mammakarzinomzellen fördert (Bourguignon et al., 2000a; b; Minard et al., 2006).

Bei Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit wird deutlich, dass Rac3 und Tiam1 die Migration in benignen Prostataepithelzellen steigern und damit eine weitere wichtige Voraussetzung für die Tumorinvasion erfüllen.

2.5 Effekte auf die Invasion

Die Tumordinvasion stellt einen komplexen biologischen Prozess dar, der zwar sehr eng mit der Zellmigration verbunden ist, allerdings müssen die Zellen auch in der Lage sein, Zell-Zellkontakte aufzulösen, räumlich und zeitlich begrenzte Zell-Substratkontakte auszubilden und die extrazelluläre Matrix zu degradieren (Engers und Gabbert, 2000; Ridley, 2004).

Die Untersuchung des Invasionsverhaltens der transfizierten BPH-1-Zellen war im Rahmen dieser Arbeit zunächst gar nicht geplant, weil es sich schließlich um benigne Zellen handelte. Da in den zuvor durchgeführten Untersuchungen die Überexpression von aktivem Rac3 allerdings mehrere zellbiologische Funktionen in Richtung auf einen aggressiven Phänotyp der benignen prostaticen Epithelzellen *in vitro* beeinflusste, wurde schließlich doch der *Matrigel-Invasionsassay* durchgeführt (Abb. IV.12).

Hierbei konnte gezeigt werden, dass nur V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3 im Vergleich zu den mock-transfizierten Kontrollzellen eine signifikant gesteigerte Invasion bewirkten ($p < 0,05$). Das Invasionsverhalten von wt-Rac3, FL-Tiam und C1199-Tiam war dagegen zwar tendenziell erhöht, allerdings in zwei von drei Versuchen nicht signifikant ($p > 0,05$).

Beim Vergleich dieser Ergebnisse, die das Invasionsverhalten betreffen, mit denen des Rac-Aktivitätsassays (Abb. IV.2) fällt auf, dass nur die Zellen die aktives Rac3 überexprimieren, also V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3, zu einer signifikant gesteigerten Invasion führen.

In verschiedenen anderen Zelllinien konnte eine gesteigerte Invasion sowohl durch konstitutiv aktives Rac als auch durch aktives Tiam1 festgestellt werden (Keely et al., 1997; Michiels et al., 1995). Die siRNA-vermittelte Depletion von Rac3 bewirkte eine ausgeprägte Hemmung der Invasion in Glioblastom- und Mammakarzinomzellen (Chan et al., 2005), während die Überexpression von aktivem Rac3 in einem verstärkten Invasionspotenzial von Mammakarzinomzellen resultierte (Baugher et al., 2005). Auf der anderen Seite führten Tiam1 und Rac1 in Ras-transformierten MDCK-Zellen zu einer Hemmung der Invasion *in vitro*, indem sie die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zelladhäsion förderten (Hordijk et al., 1997). Diese gegensätzlichen Ergebnisse lassen eine zelltypabhängige Funktion des Tiam1/Rac-Signalweges vermuten (Engers et al., 2000).

Da nachgewiesen werden konnte, dass sowohl V12-Rac3 als auch FL-Tiam/wt-Rac3 zu einem gesteigerten Invasionspotenzial benigner prostaticer Epithelzellen führen, könnte der Tiam1/Rac3-Signalweg eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung von Prostatakarzinomen *in vivo* spielen.

2.6 Effekte auf die onkogene Transformation

In den zuvor erwähnten Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass sowohl aktives Rac3 – in Form von V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3 – als auch C1199-Tiam1 mehrere zellbiologische Funktionen der BPH-1-Zellen in Richtung auf einen aggressiven Phänotyp beeinflussen, dass allerdings nur BPH-1-Zellen mit deutlich gesteigerter Rac3-Aktivität auch eine signifikant gesteigerte Invasivität aufweisen. Mithilfe von zwei verschiedenen *Transformationsassays* sollte nun das onkogene Potenzial dieser beiden Proteine in den benignen Prostataepithelzellen untersucht werden, um genauere Aussagen über ihre Rolle bei der Entstehung humaner Prostatakarzinome machen zu können.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass im *Soft agar assay* (vgl. Abb. IV.13) nur die Zelllinien, die aktives Rac3 überexprimierten, zur Ausbildung eines verankerungsunabhängigen Wachstums fähig waren. Während das konstitutiv aktive V12-Rac3 eine ausgesprochen starke und relativ schnelle Kolonienbildung induzierte, war bei FL-Tiam/wt-Rac3 ein vergleichsweise gering transformierender Effekt vorhanden. Im Gegensatz dazu konnte bei den anderen Zelllinien kein verankerungsunabhängiges Wachstum nachgewiesen werden. Im *Colony formation assay* (vgl. Abb. IV.14) dagegen induzierten neben V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3 auch FL-Tiam und wt-Rac3 die Ausbildung dreidimensionaler Kolonien, während die Leervektor-transfizierten Kontrollzellen und C1199-Tiam dazu nicht in der Lage waren.

Da sowohl die Ausbildung dreidimensionaler Kolonien im *Colony formation assay* als auch die Proliferation im *Weichagarassay* Ausdruck der Transformation sind, kann geschlossen werden, dass aktives Rac3 eine transformierende Eigenschaft in benignen Prostataepithelzellen besitzt. Bei Übertragung dieser Ergebnisse auf humane Prostatakarzinome deutet dies darauf hin, dass aktives Rac3 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Prostatakarzinomen spielen könnte. Wichtig für die Verhältnisse *in vivo* ist dabei, dass nicht nur das mutierte V12-Rac3 transformierend wirkte, sondern dass die gleichzeitige Überexpression von FL-Tiam und wt-Rac3 ebenso zur Transformation in der Lage war. Während aktivierende Mutationen in Rho-ähnlichen GTPasen nämlich bislang kaum beschrieben sind (Joyce und Cox, 2003; Mertens et al., 2003b), konnte die gleichzeitige Überexpression von Tiam1 und Rac3 in den meisten Prostatakarzinomen und HG-PINs bereits nachgewiesen werden (Engers et al., 2006a; Engers et al., 2007).

Bei Betrachtung des onkogenen Potenzials der Rac3-exprimierenden Zellen im Vergleich zu mock-transfizierten Kontrollzellen fällt auf, dass wt-Rac3 nur ein schwaches Kolonienwachstum im *Colony formation assay* induzierte, während mock zu gar keiner Transformation, FL-Tiam/wt-Rac3 zu einer schwachen und V12-Rac3 zu einer starken onkogenen

Transformation führten. Daher kann geschlussfolgert werden, dass das onkogene Potenzial von Rac3 umso größer ist, je mehr aktives Rac3 die Zellen enthalten.

Aus weiteren Untersuchungen mit Rac-Proteinen ist bekannt, dass Rac-GTPasen auch zur Transformation anderer Zelllinien in der Lage sind. So konnten für konstitutiv aktives Rac3 vollständig transformierende Eigenschaften in NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden (Joyce und Cox, 2003; Keller et al., 2005). Beispielsweise führte auch die Aktivierung von Rac1 durch Tiam1 in NIH3T3-Zellen zur onkogenen Transformation (van Leeuwen et al., 1995). Ebenso ist Rac1 wesentlich verantwortlich für die Ras- und Src-induzierte Transformation von NIH3T3-Fibroblasten (Qiu et al., 1995; Servitja et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass auch die gleichzeitige Überexpression der beiden nichtmutierten Proteine von Rac3 und seinem Aktivator Tiam1 (FL-Tiam/wt-Rac3) zu einer vollständigen onkogenen Transformation fähig ist. Dies weist darauf hin, dass der Tiam1/Rac3-Signalweg tatsächlich eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung des Prostatakarzinoms *in vivo* spielen dürfte.

Etwas unerwartet war jedoch, dass C1199-Tiam überhaupt kein transformierendes Potenzial in den BPH-1-Zellen aufwies, während FL-Tiam die Ausbildung dreidimensionaler Kolonien im *Colony formation assay* induzierte und damit schwach transformierend wirkte. In anderen Untersuchungen war dagegen nur das stabilere N-terminal *trunkierte* Tiam1-Protein zur onkogenen Transformation fähig, während das Volllängen-Protein dazu nicht in der Lage war (van Leeuwen et al., 1995). Übereinstimmend damit waren Mäuse, denen Tiam1 fehlte, resistent gegenüber der Entwicklung Ras-induzierter Hauttumore (Malliri et al., 2002). Des Weiteren konnte am Beispiel humaner Nierenzellkarzinome auch eine Punktmutation in der PHn-CC-Ex-Domäne von Tiam1 nachgewiesen werden, die eine Hyperaktivität des Proteins bewirkte und zur onkogenen Transformation benigner NIH3T3-Zellen führte (Engers et al., 2000). Obwohl im Rahmen dieser Arbeit zuvor gezeigt werden konnte, dass C1199-Tiam einige zellbiologische Funktionen in Richtung auf einen aggressiveren Phänotyp beeinflusst, konnte in den BPH-1-Zellen weder ein signifikanter Effekt auf die Invasion noch auf die onkogene Transformation nachgewiesen werden. Ein denkbarer Grund hierfür ist, dass C1199-Tiam lediglich endogen vorhandenes Rac aktivieren kann und bereits im Rac-Aktivitätsassay gezeigt werden konnte, dass die Menge von aktivem Rac in C1199-Tiam-transfizierten BPH-1-Zellen nur gering ist. Möglicherweise reicht die Menge an endogenem Rac3 in BPH-1-Zellen nicht aus, damit C1199-Tiam zur onkogenen Transformation und signifikanten Invasionssteigerung dieser Zellen in den durchgeführten Experimenten führen kann.

So führten von den drei Zelllinien, die in den vorherigen Versuchen einen deutlich aggressiveren Phänotyp induzierten (nämlich V12-Rac3, FL-Tiam/wt-Rac3 und C1199-Tiam), nur V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3, also die Zellen mit gesteigerter Rac3-Aktivität, zu einer signifikant gesteigerten Invasion und vollständigen onkogenen Transformation, während C1199-Tiam kein onkogenes Potenzial bzw. signifikant gesteigertes Invasionspotenzial aufweisen konnte.

3 Schlussfolgerungen mit Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass aktives Rac3 nicht nur in Form von konstitutiv aktivem V12-Rac3, sondern auch durch gleichzeitige Überexpression von FL-Tiam/wt-Rac3 zu einer vollständigen onkogenen Transformation benigner prostaticher Epithelzellen *in vitro* führt. Zudem wurden durch aktives Rac3 verschiedene zellbiologische Funktionen in Richtung auf einen aggressiven Pänotyp beeinflusst. So induzierte aktives Rac3 nicht nur eine verminderte Zell-Zelladhäsion, sondern auch die Ausbildung von *membrane ruffling* als Zeichen einer gesteigerten Zellmobilität. Auch die Zell-Substratadhäsion an Laminin wurde durch aktives Rac3 vermindert, was auf eine reduzierte Verankerung der Zellen an der Basalmembran hindeutet. In Übereinstimmung damit bewirkte aktives Rac3 nicht nur eine signifikant gesteigerte Migration, sondern auch eine deutlich erhöhte Invasion im Vergleich zu den mock- bzw. mock/mock-transfizierten Kontrollzellen. Diese durch Rac3 beeinflussten Zellfunktionen stellen im Grunde entscheidende Voraussetzungen sowohl für die onkogene Transformation als auch für eine klinisch relevante Tumordinvasion und Metastasierung dar. Vor dem Hintergrund, dass sowohl Rac3 als auch Tiam1 in den meisten Prostatakarzinomen und prämaligen HG-PINs signifikant stärker exprimiert sind als im jeweils korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel, könnte der Tiam1/Rac3-Signalweg daher eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms spielen.

Auch für C1199-Tiam1 konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass viele Funktionen in ähnlicher Art wie bei Rac3 beeinflusst werden. Im Gegensatz zu V12-Rac3 und FL-Tiam/wt-Rac3 konnte C1199-Tiam jedoch die Invasion nur tendenziell erhöhen und war zur onkogenen Transformation nicht fähig. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise die endogen in BPH-1-Zellen vorhandene Menge von Rac3 nicht ausreicht, um nach Aktivierung eine vollständige onkogene Transformation dieser Zellen zu erreichen. Dies wiederum ist ein Hinweis dafür, dass die alleinige Überexpression von Tiam1 für die Entstehung des Prostatakarzinoms nicht ausreicht, während die gleichzeitige Überexpression von Tiam1 und Rac3 dagegen zur Entstehung beitragen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun also gezeigt werden, dass die Aktivierung von Rac3 über ein kritisches Maß hinaus für die vollständige onkogene Transformation benigner Prostataepithelzellen *in vitro* ausreicht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass neben einer konstitutiven Aktivierung von Rac3 bereits die gleichzeitige Überexpression von FL-Tiam und wt-Rac3 genügt, um benigne prostatiche Epithelzellen vollständig onkogen zu transformieren. Dennoch war offensichtlich, dass das onkogene Potenzial stark vom Aktivitätsstatus von Rac3 abhing und V12-Rac3 ein viel höheres transformierendes Potenzial

aufwies als FL-Tiam/wt-Rac3. Bislang konnten kaum aktivierende Mutationen Rho-ähnlicher GTPasen in humanen Tumoren gefunden werden, jedoch konnten Hwang et al. (2004, 2005a, 2005b) Mutationen von Rac1, Rac2 und Rac3 mit unklarer Bedeutung in Hirntumoren nachweisen. Es wäre daher interessant, verschiedene Prostatakarzinome auf das Vorkommen potenziell aktivierender Mutationen von Rac3 und auch von Tiam1 zu untersuchen, insbesondere da aktivierende Tiam1-Mutationen in humanen Nierenzellkarzinomen gefunden werden konnten (Engers et al., 2000).

Zudem wäre es wissenswert herauszufinden, ob die Aktivierung des Rac3-Signalwegs auch zur Transformation von Prostatazellen *in vivo* ausreicht. Das Ziel weiterer Untersuchungen könnte außerdem sein, die funktionelle Relevanz von Rac3 und Tiam1 in der Progression des Prostatakarzinoms mithilfe von Karzinomzelllinien zu analysieren. Von Interesse wäre dabei, den Einfluss dieser Proteine nicht nur auf die Invasion und Metastasierung, sondern beispielsweise auch auf die Tumorangiogenese zu klären. In diesem Zusammenhang könnte auch die Bedeutung von Rac3 für die Progression von androgenabhängigen zu androgenunabhängigen Prostatakarzinomen ermittelt werden. Dabei könnte auch der Einsatz von siRNAs (engl. *small interfering RNA*) zum gezielten Ausschalten von Komponenten des Rac3-Signalwegs weitere Einblicke geben.

Ebenso wäre es sicherlich interessant, beteiligte molekulare Mechanismen genauer zu untersuchen, z. B. die Auswirkungen des Tiam1/Rac3-Signalweges auf die Sekretion der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 als auch auf deren spezifische Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2. Außerdem würde die Analyse des Einflusses von Rac3 auf potenzielle Effektoren wie ERK-1/-2, p70-S6K, Akt, JNK, p38, NFκB p65 und Cyclin D1 weiterführende wichtige Einblicke in die Rac3-abhängige Signaltransduktion gewähren.

Vor dem Hintergrund der Überexpression von Rac3 und Tiam1 in den meisten Prostatakarzinomen und prämaligen HG-PINs deuten die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse also stark darauf hin, dass der Tiam1/Rac3-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms spielt. Dies lässt vermuten, dass die Ausschaltung bzw. Hemmung dieses Signalwegs ein attraktives Ziel in der Therapie von Prostatakarzinomen darstellen könnte.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Der Tiam1/Rac-Signalweg hat eine wichtige Bedeutung in der Regulation der Zelladhäsion, Migration, onkogenen Transformation, Tumorzellinvasion und Metastasierung. Allerdings ist noch sehr wenig über die funktionelle Bedeutung von Rac3, einer von drei verschiedenen Isoformen der Rho-ähnlichen GTPase Rac, bekannt. Tiam1 ist ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor, der Rac-Proteine spezifisch aktiviert, dessen funktionelle Bedeutung im Prostatakarzinom jedoch noch weitgehend unklar ist.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte allerdings erstmals gezeigt werden, dass Rac3 und Tiam1 sowohl in den meisten Prostatakarzinomen als auch in *high-grade* prostaticen intra-epithelialen Neoplasien (HG-PIN), den Vorläuferläsionen des Prostatakarzinoms, signifikant stärker exprimiert sind als im jeweils korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel. Zudem sagten diese Überexpressionen einen aggressiven klinischen Verlauf vorher. Aufgrund dieser Ergebnisse sowie unter Beachtung des transformierenden Potenzials von Rac3 und Tiam1 in anderen Zelllinien könnte der Tiam1/Rac3-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Prostatakarzinogenese spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher erstmals die funktionelle Bedeutung der Rho-ähnlichen GTPase Rac3 und des Rac-spezifischen Aktivators Tiam1 für die Entstehung des Prostatakarzinoms untersucht. Hierzu wurden benigne prostatiche Epithelzellen (BPH-1-Zellen) stabil mit leerem Vektor, wt-Rac3, konstitutiv aktivem V12-Rac3, FL-Tiam und aktivem C1199-Tiam transfiziert. Da bislang kaum aktivierende Mutationen von Rho-ähnlichen GTPasen in menschlichen Tumoren gefunden werden konnten, die Überexpression von Rac3 und seinem Aktivator Tiam1 in Prostatakarzinomen jedoch miteinander korrelierte, wurden außerdem - zur Imitierung der Verhältnisse *in vivo* - BPH-1-Zellen auch gleichzeitig mit FL-Tiam und wt-Rac3 bzw. mit den beiden leeren Vektoren ko-transfiziert.

In anschließenden funktionellen *in vitro* Untersuchungen zeigte sich zusammenfassend, dass aktives Rac3 in Form von konstitutiv aktivem V12-Rac3 bzw. ko-transfiziertem FL-Tiam/wt-Rac3 zu einer vollständigen onkogenen Transformation gutartiger Prostataepithelzellen *in vitro* führt und zudem mehrere zellbiologische Funktionen in Richtung auf einen aggressiven Phänotyp beeinflusst. Dazu gehört die Induktion von *membrane ruffling* und eines dissoziierteren Wachstumsmusters, die Hemmung der Zell-Substratadhäsion an Laminin, eine Steigerung der Zellmigration sowie die Induktion der Fähigkeit zur Zellinvasion.

Vor dem Hintergrund der im Vorfeld dieser Arbeit nachgewiesenen Überexpression von Rac3 und Tiam1 in den meisten HG-PINs und Prostatakarzinomen deuten diese Ergebnisse daher darauf hin, dass die Tiam1/Rac3-abhängige Signaltransduktion eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms *in vivo* spielen könnte.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Alken, W. und Walz, P.** (1998): Urologie. London, UK, Chapman and Hall
- Andreoiu, M. und Cheng, L.** (2010): Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Hum Pathol* **41**, 781-793
- Barrett, J. C.** (1993): Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives* **100**, 9-20
- Bastacky, S. I., Wojno, K. J., Walsh, P. C., Carmichael, M. J. und Epstein, J. I.** (1995): Pathological features of hereditary prostate cancer. *The Journal of Urology* **153**, 987-992
- Baughner, P. J., Krishnamoorthy, L., Price, J. E. und Dharmawardhane, S. F.** (2005): Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Breast Cancer Research* **7**, R965-R974
- Bertram, J. S.** (2000): The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* **21**, 167-223
- Bickers, B. und Aukim-Hastie, C.** (2009): New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer--the post PSA era. *Anticancer Research* **29**, 3289-3298
- Birchmeier, W. und Behrens, J.** (1994): Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et Biophysica Acta* **1198**, 11-26
- Böcker, W., Denk, H. und Heitz, P. U.** (2001): Pathologie, 2. Auflage. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München
- Böcker, W., Denk, H. und Heitz, P. U.** (2004): Pathologie, 3. Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München
- Böcker, W., Denk, H. und Heitz, P. U.** (2008): Pathologie, 4. Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München
- Borley, N. und Feneley, M. R.** (2009): Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian J Androl* **11**, 74-80
- Bosco, E. E., Mulloy, J. C. und Zheng, Y.** (2009): Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 370-374
- Bostwick, D. G., Liu, L., Brawer, M. K. und Qian, J.** (2004): High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Reviews in urology* **6**, 171-179
- Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L. und Chen, Y. W.** (2000a): Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. *The Journal of Cell Biology* **150**, 177-191
- Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L. und Chen, Y. W.** (2000b): CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *The Journal of biological chemistry* **275**, 1829-1838

- Bratt, O., Kristoffersson, U., Lundgren, R. und Olsson, H.** (1999): Familial and hereditary prostate cancer in southern Sweden. A population-based case-control study. *European Journal of Cancer* **35**, 272-277
- Buchsbaum, R. J., Connolly, B. A. und Feig, L. A.** (2002): Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 4073-4085
- Buchsbaum, R. J., Connolly, B. A. und Feig, L. A.** (2003): Regulation of p70 S6 kinase by complex formation between the Rac guanine nucleotide exchange factor (Rac-GEF) Tiam1 and the scaffold spinophilin. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 18833-18841
- Buday, L. und Downward, J.** (2008): Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 178-187
- Bustelo, X. R., Sauzeau, V. und Berenjeno, I. M.** (2007): GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays* **29**, 356-370
- Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. und Lengauer, C.** (1999): Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends in Cell Biology* **9**, M57-M60
- Castronovo, V.** (1993): Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis. *Invasion Metastasis* **13**, 1-30
- Chan, A. Y., Coniglio, S. J., Chuang, Y. Y., Michaelson, D., Knaus, U. G., Philips, M. R. und Symons, M.** (2005): Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene* **24**, 7821-7829
- Chen, H. und Antonarakis, S. E.** (1995): Localization of a human homolog of the mouse Tiam-1 gene to chromosome 21q22.1. *Genomics* **30**, 123-7
- Cheng, L., Montironi, R., Bostwick, D. G., Lopez-Beltran, A. und Berney, D. M.** (2012): Staging of prostate cancer. *Histopathology* **60**, 87-117
- Chirco, R., Liu, X. W., Jung, K. K. und Kim, H. R.** (2006): Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer and Metastasis Reviews* **25**, 99-113
- Chou, M. M. und Blenis, J.** (1996): The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. *Cell* **85**, 573-583
- Clark, G. J., Cox, A. D., Graham, S. M. und Der, C. J.** (1995): Biological assays for Ras transformation. *Methods in enzymology* **255**, 395-412
- Coleman, W. B. und Tsongalis, G. J.** (1995): Multiple mechanisms account for genomic instability and molecular mutation in neoplastic transformation. *Clin Chem* **41**, 644-657
- Compton, S. J. und Jones, C. G.** (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**, 369-374
- Corbetta, S., Gualdoni, S., Albertinazzi, C., Paris, S., Croci, L., Consalez, G. G. und de Curtis, I.** (2005): Generation and characterization of Rac3 knockout mice. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 5763-5776

- Crompton, A. M., Foley, L. H., Wood, A., Roscoe, W., Stokoe, D., McCormick, F., Symons, M. und Bollag, G.** (2000): Regulation of Tiam1 nucleotide exchange activity by pleckstrin domain binding ligands. *The Journal of biological chemistry* **275**, 25751-25759
- Dimri, G., Band, H. und Band, V.** (2005): Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Research* **7**, 171-179
- Dong, J. T.** (2001): Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* **20**, 173-93
- Ehler, E., van Leeuwen, F., Collard, J. G. und 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. *Molecular and Cellular Neurosciences* **9**, 1-12
- Emmert-Buck, M. R., Vocke, C. D., Pozzatti, R. O., Duray, P. H., Jennings, S. B., Florence, C. D., Zhuang, Z., Bostwick, D. G., Liotta, L. A. und Linehan, W. M.** (1995): Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer research* **55**, 2959-2962
- Engers, R.** (2001): Funktionelle Bedeutung des Tiam1/Rac1-Signalwegs für das Invasionsverhalten maligner Tumoren: eine Untersuchung am Beispiel humaner Nierenzellkarzinome. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität
- Engers, R. und Gabbert, H. E.** (1998): Basismechanismen der Metastasierung *Der Onkologe* **8**, 682-688
- Engers, R. und Gabbert, H. E.** (2000): Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **126**, 682-692
- Engers, R., Gerharz, C. D., Donner, A., Mrzyk, S., Krause-Paulus, R., Petek, O. und 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. *International Journal of Cancer* **80**, 406-412
- Engers, R., Mueller, M., Walter, A., Collard, J. G., Willers, R. und Gabbert, H. E.** (2006a): Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinomas. *British Journal of Cancer* **95**, 1081-1086
- Engers, R., Springer, E., Kehren, V., Simic, T., Young, D. A., Beier, J., Klotz, L. O., Clark, I. M., Sies, H. und Gabbert, H. E.** (2006b): Rac upregulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression by redox-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase signaling. *The FEBS journal* **273**, 4754-4769
- Engers, R., Springer, E., Michiels, F., Collard, J. G. und Gabbert, H. E.** (2001): Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *The Journal of biological chemistry* **276**, 41889-41897
- Engers, R., Ziegler, S., Mueller, M., Walter, A., Willers, R. und Gabbert, H. E.** (2007): Prognostic relevance of increased Rac GTPase expression in prostate carcinomas. *Endocrine-Related Cancer* **14**, 245-256

- Engers, R., Zwaka, T. P., Gohr, L., Weber, A., Gerharz, C. D. und Gabbert, H. E.** (2000): Tiam1 mutations in human renal-cell carcinomas. *International Journal of Cancer* **88**, 369-376
- Epstein, J. I.** (2010): An update of the Gleason grading system. *The Journal of Urology* **183**, 433-440
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A.** (2002): Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635
- Fleming, I. N., Batty, I. H., Prescott, A. R., Gray, A., Kular, G. S., Stewart, H. und Downes, C. P.** (2004): Inositol phospholipids regulate the guanine-nucleotide-exchange factor Tiam1 by facilitating its binding to the plasma membrane and regulating GDP/GTP exchange on Rac1. *The Biochemical Journal* **382**, 857-865
- Folkman, J.** (2006): Angiogenesis. *Annual Review of Medicine* **57**, 1-18
- Friedl, P., Hegerfeldt, Y. und Tusch, M.** (2004): Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* **48**, 441-449
- Friedl, P. und Wolf, K.** (2003): Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**, 362-374
- Fritz, G., Just, I. und Kaina, B.** (1999): Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *International Journal of Cancer* **81**, 682-687
- Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T. und Pestell, R. G.** (2004): Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* **145**, 5439-5447
- Gabbert, H.** (1985): Mechanisms of tumor invasion: evidence from in vivo observations. *Cancer and Metastasis Reviews* **4**, 293-309
- Giancotti, F. G. und Ruoslahti, E.** (1999): Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-1032
- Grafström, R. C., Norén, U. G., Zheng, X., Elfving, A. und Sundqvist, K.** (1997): Growth and Transformation of Human Oral Epithelium In Vitro *Recent Results in Cancer Research* **143**
- Gronberg, H.** (2003): Prostate cancer epidemiology. *Lancet* **361**, 859-64
- Gui, G. P., Wells, C. A., Yeomans, P., Jordan, S. E., Vinson, G. P. und Carpenter, R.** (1996): Integrin expression in breast cancer cytology: a novel predictor of axillary metastasis. *European Journal of Surgical Oncology* **22**, 254-258
- Haataja, L., Groffen, J. und Heisterkamp, N.** (1997): Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 20384-20388
- Habets, G. G., Scholtes, E. H., Zuydgeest, D., van der Kammen, R. A., Stam, J. C., Berns, A. und 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* **77**, 537-549
- Habets, G. G., van der Kammen, R. A., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Hagemeijer, A. und Collard, J. G.** (1995): The invasion-inducing TIAM1 gene maps to human chromosome band 21q22 and mouse chromosome 16. *Cytogenetics and Cell Genetics* **70**, 48-51

- Haeusler, L. C., Blumenstein, L., Stege, P., Dvorsky, R. und Ahmadian, M. R.** (2003): Comparative functional analysis of the Rac GTPases. *FEBS Letters* **555**, 556-560
- Hajdo-Milasnovic, A., Ellenbroek, S. I., van Es, S., van der Vaart, B. und Collard, J. G.** (2007): Rac1 and Rac3 have opposing functions in cell adhesion and differentiation of neuronal cells. *Journal of cell science* **120**, 555-566
- Hajdo-Milasnovic, A., van der Kammen, R. A., Moneva, Z. und Collard, J. G.** (2009): Rac3 inhibits adhesion and differentiation of neuronal cells by modifying GIT1 downstream signaling. *Journal of cell science* **122**, 2127-2136
- Hall, A.** (1998): Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science (New York, N.Y.)* **279**, 509-514
- Hall, A. und Nobes, C. D.** (2000): Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 965-970
- Hamelers, I. H., Olivo, C., Mertens, A. E., Pegtel, D. M., van der Kammen, R. A., Sonnenberg, A. und Collard, J. G.** (2005): The Rac activator Tiam1 is required for (alpha)3(beta)1-mediated laminin-5 deposition, cell spreading, and cell migration. *J Cell Biol* **171**, 871-881
- Hanahan, D. und Folkman, J.** (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A.** (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70
- Hayward, S. W., Dahiya, R., Cunha, G. R., Bartek, J., Deshpande, N. und Narayan, P.** (1995): Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **31**, 14-24
- Heeg, S., Doebele, M., von Werder, A. und Opitz, O. G.** (2006): In vitro transformation models: modeling human cancer. *Cell Cycle* **5**, 630-634
- Herbrand, U.** (2003): Zellbiologische Untersuchung der Regulatoren der Rho-GTPasen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Hordijk, P. L., ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Oomen, L. C. und Collard, J. G.** (1997): Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science (New York, N.Y.)* **278**, 1464-1466
- Hyytinen, E. R., Frierson, H. F., Jr., Boyd, J. C., Chung, L. W. und Dong, J. T.** (1999): Three distinct regions of allelic loss at 13q14, 13q21-22, and 13q33 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **25**, 108-114
- Iczkowski, K. A. und Lucia, M. S.** (2011): Current perspectives on Gleason grading of prostate cancer. *Curr Urol Rep* **12**, 216-222
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T. und Thun, M. J.** (2008): Cancer statistics, 2008. *A Cancer Journal For Clinicians* **58**, 71-96
- Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., Klein, J. U., Lee, R. J., Segall, J. E., Westwick, J. K., Der, C. J. und Pestell, R. G.** (1999): Integration of Rac-

dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 25245-25249

Joyce, P. L. und Cox, A. D. (2003): Rac1 and Rac3 are targets for geranylgeranyltransferase I inhibitor-mediated inhibition of signaling, transformation, and membrane ruffling. *Cancer research* 63, 7959-7967

Kamai, T., Yamanishi, T., Shirataki, H., Takagi, K., Asami, H., Ito, Y. und Yoshida, K. (2004): Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clinical Cancer Research* 10, 4799-4805

Karan, D., Lin, M. F., Johansson, S. L. und Batra, S. K. (2003): Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas. *International Journal of Cancer* 103, 285-293

Keely, P. J., Westwick, J. K., Whitehead, I. P., Der, C. J. und Parise, L. V. (1997): Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 390, 632-636

Keller, P. J., Gable, C. M., Wing, M. R. und Cox, A. D. (2005): Rac3-mediated transformation requires multiple effector pathways. *Cancer research* 65, 9883-9890

Kopnin, B. P. (2000): Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 65, 2-27

Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S. und Kaibuchi, K. (1998): Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science (New York, N.Y.)* 281, 832-835

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lambert, J. M., Lambert, Q. T., Reuther, G. W., Malliri, A., Siderovski, D. P., Sondek, J., Collard, J. G. und Der, C. J. (2002): Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nature Cell Biology* 4, 621-625

Latil, A., Bieche, I., Pesche, S., Volant, A., Valeri, A., Fournier, G., Cussenot, O. und Lidereau, R. (1999): Loss of heterozygosity at chromosome arm 13q and RB1 status in human prostate cancer. *Human Pathology* 30, 809-815

Lauffenburger, D. A. und Horwitz, A. F. (1996): Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369

Li, L. C., Okino, S. T. und Dahiya, R. (2004): DNA methylation in prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1704, 87-102

Liotta, L. A. (1986): Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer research* 46, 1-7

Liotta, L. A. und Stetler-Stevenson, W. G. (1991): Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer research* 51, 5054s-5059s

Liu, L., Wu, D. H. und Ding, Y. Q. (2005): Tiam1 gene expression and its significance in colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 11, 705-707

- Liu, L., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, S. und Ding, Y.** (2006): Lentivirus-mediated silencing of Tiam1 gene influences multiple functions of a human colorectal cancer cell line. *Neoplasia* **8**, 917-924
- Liu, S. Y., Yen, C. Y., Yang, S. C., Chiang, W. F. und Chang, K. W.** (2004): Overexpression of Rac-1 small GTPase binding protein in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **62**, 702-707
- Malliri, A. und Collard, J. G.** (2003): Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 583-589
- Malliri, A., van der Kammen, R. A., Clark, K., van der Valk, M., Michiels, F. und Collard, J. G.** (2002): Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* **417**, 867-871
- Mareel, M., Boterberg, T., Noe, V., Van Hoorde, L., Vermeulen, S., Bruyneel, E. und Bracke, M.** (1997): E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion. *Journal of cellular physiology* **173**, 271-274
- Mareel, M. und Leroy, A.** (2003): Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* **83**, 337-376
- Mareel, M., Oliveira, M. J. und Madani, I.** (2009): Cancer invasion and metastasis: interacting ecosystems. *Virchows Arch* **454**, 599-622
- Mareel, M. M., Van Roy, F. M. und Bracke, M. E.** (1993): How and when do tumor cells metastasize? *Crit Rev Oncog* **4**, 559-594
- Mathews, S. T., Plaisance, E. P. und Kim, T.** (2009): Imaging systems for westerns: chemiluminescence vs. infrared detection. *Methods Mol Biol* **536**, 499-513
- Mertens, A. E., Pegtel, D. M. und Collard, J. G.** (2006): Tiam1 takes PART in cell polarity. *Trends in Cell Biology* **16**, 308-316
- Mertens, A. E., Roovers, R. C. und Collard, J. G.** (2003): Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Lett* **546**, 11-16
- Mertens, A. E., Rygiel, T. P., Olivo, C., van der Kammen, R. und Collard, J. G.** (2005): The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *The Journal of Cell Biology* **170**, 1029-1037
- Michiels, F., Habets, G. G., Stam, J. C., van der Kammen, R. A. und Collard, J. G.** (1995): A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* **375**, 338-340
- Michiels, F., Stam, J. C., Hordijk, P. L., van der Kammen, R. A., Ruuls-Van Stalle, L., Feltkamp, C. A. und Collard, J. G.** (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. *The Journal of cell biology* **137**, 387-398
- Michiels, F., van der Kammen, R. A., Janssen, L., Nolan, G. und Collard, J. G.** (2000): Expression of Rho GTPases using retroviral vectors. *Methods in enzymology* **325**, 295-302
- Minard, M. E., Ellis, L. M. und Gallick, G. E.** (2006): Tiam1 regulates cell adhesion, migration and apoptosis in colon tumor cells. *Clinical & Experimental Metastasis* **23**, 301-313

- Minard, M. E., Kim, L. S., Price, J. E. und Gallick, G. E.** (2004): The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression. *Breast Cancer Research and Treatment* **84**, 21-32
- Mira, J. P., Benard, V., Groffen, J., Sanders, L. C. und Knaus, U. G.** (2000): Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 185-189
- Mitchison, T. J. und Cramer, L. P.** (1996): Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* **84**, 371-379
- Moiola, C., De Luca, P., Gardner, K., Vazquez, E. und De Siervi, A.** (2010): Cyclin T1 overexpression induces malignant transformation and tumor growth. *Cell Cycle* **9**, 3119-3126
- Morris, C. M., Haataja, L., McDonald, M., Gough, S., Markie, D., Groffen, J. und Heisterkamp, N.** (2000): The small GTPase RAC3 gene is located within chromosome band 17q25.3 outside and telomeric of a region commonly deleted in breast and ovarian tumours. *Cytogenetics and Cell Genetics* **89**, 18-23
- Müller, E.** (2010): Tiam1/BRCA2-Signaltransduktion: molekulare Grundlagen und funktionelle Relevanz. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273
- Mutch, D. G. und DiSaia, P. J.** (2007): Genes and Cancer. Clinical Gynecologic Oncology. Di Saia, P. J. und Creasman, W. T., Elsevier, 637-667
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G. und Halazonetis, T. D.** (2010): Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 220-228
- Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L. und Matrisian, L. M.** (2000): Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology* **18**, 1135-1149
- Nelson, W. G., De Marzo, A. M. und Isaacs, W. B.** (2003): Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine* **349**, 366-381
- Nobes, C. D. und Hall, A.** (1999): Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *The Journal of Cell Biology* **144**, 1235-1244
- Nupponen, N. und Visakorpi, T.** (1999): Molecular biology of progression of prostate cancer. *European Urology* **35**, 351-354
- Nupponen, N. N., Kakkola, L., Koivisto, P. und Visakorpi, T.** (1998): Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *The American Journal of Pathology* **153**, 141-148
- Nwosu, V., Carpten, J., Trent, J. M. und Sheridan, R.** (2001): Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. *Human Molecular Genetics* **10**, 2313-2318

- Olson, M. F., Ashworth, A. und Hall, A.** (1995): An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science (New York, N.Y.)* **269**, 1270-1272
- Pan, Y., Bi, F., Liu, N., Xue, Y., Yao, X., Zheng, Y. und Fan, D.** (2004): Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **315**, 686-691
- Partin, A. W., Kattan, M. W., Subong, E. N., Walsh, P. C., Wojno, K. J., Oesterling, J. E., Scardino, P. T. und Pearson, J. D.** (1997): Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *Jama* **277**, 1445-1451
- Payne, H. und Mason, M.** (2011): Androgen deprivation therapy as adjuvant/neoadjuvant to radiotherapy for high-risk localised and locally advanced prostate cancer: recent developments. *Br J Cancer* **105**, 1628-1634
- Peltomaki, P.** (2011): Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res* **318**, 299-310
- Perner, S., Schmidt, F. H., Hofer, M. D., Kuefer, R. und Rubin, M.** (2007): [TMPRSS2-ETS gene fusion in prostate cancer]. *Der Urologe A* **46**, 754-760
- Polette, M., Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Clavel, C. und Birembaut, P.** (2004): Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **49**, 179-186
- Qiu, R. G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F. und Symons, M.** (1995): An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* **374**, 457-459
- Rao, K., Alper, O., Opheim, K. E., Bonnet, G., Wolfe, K., Bryant, E., O'Hara Larivee, S., Porter, P. und McDougall, J. K.** (2006): Cytogenetic characterization and H-ras associated transformation of immortalized human mammary epithelial cells. *Cancer Cell International* **6**, 15
- Ray, J. M. und Stetler-Stevenson, W. G.** (1994): The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *European Respiratory Journal* **7**, 2062-2072
- Rehm, H. und Letzel, T.** (2006): Der Experimentator - Proteinbiochemie/Proteomics Spektrum Akademischer Verlag
- Renan, M. J.** (1993): How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Molecular Carcinogenesis* **7**, 139-146
- Ridley, A. J.** (2001): Cyclin' round the cell with Rac. *Developmental Cell* **1**, 160-161
- Ridley, A. J.** (2004): Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat* **84**, 13-9
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. und Hall, A.** (1992): The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410
- Rizzo, S., Attard, G. und Hudson, D. L.** (2005): Prostate epithelial stem cells. *Cell proliferation* **38**, 363-374

Robert-Koch-Institut und Gesellschaft-der-epidemiologischen-Krebsregister-in-Deutschland (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Auflage

Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M. und Glasebrook, A. L. (1991): An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* **142**, 257-265

Ross, J. S., Jennings, T. A., Nazeer, T., Sheehan, C. E., Fisher, H. A., Kauffman, R. A., Anwar, S. und Kallakury, B. V. (2003): Prognostic factors in prostate cancer. *American journal of clinical pathology* 120 Suppl, S85-100

Rul, W., Zugasti, O., Roux, P., Peyssonnaud, C., Eyche, A., Franke, T. F., Lenormand, P., Fort, P. und Hibner, U. (2002): Activation of ERK, controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, is required for anoikis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **973**, 145-148

Sahai, E. und Marshall, C. J. (2002): RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 133-142

Sakr, W. A., Haas, G. P., Cassin, B. F., Pontes, J. E. und Crissman, J. D. (1993): The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* **150**, 379-385

Sander, E. E. und Collard, J. G. (1999): Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* **35**, 1905-1911

Sander, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F. und 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. *The Journal of Cell Biology* **143**, 1385-1398

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467

Schmid, H. P., Riesen, W. und Prikler, L. (2004): Update on screening for prostate cancer with prostate-specific antigen. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**, 71-78

Schmitz, A. A., Govek, E. E., Bottner, B. und Van Aelst, L. (2000): Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* **261**, 1-12

Schnelzer, A., Prectel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M. und Lengyel, E. (2000): Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* **19**, 3013-3020

Schulz, W. A., Ed. (2005): Molecular Biology of Human Cancers. Dordrecht, NL, Springer

Schulz, W. A., Burchardt, M. und Cronauer, M. V. (2003): Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* **9**, 437-48

Schulz, W. A. und Hatina, J. (2006): Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **10**, 100-125

Schulz, W. A. und Hoffmann, M. J. (2009): Epigenetic mechanisms in the biology of prostate cancer. *Seminars in Cancer Biology* **19**, 172-180

- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. und 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* **48**, 4827-4833
- Servitja, J. M., Marinissen, M. J., Sodhi, A., Bustelo, X. R. und Gutkind, J. S.** (2003): Rac1 function is required for Src-induced transformation. Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 34339-34346
- Shaw, L. M., Rabinovitz, I., Wang, H. H., Toker, A. und Mercurio, A. M.** (1997): Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* **91**, 949-960
- Sheetz, M. P., Felsenfeld, D., Galbraith, C. G. und Choquet, D.** (1999): Cell migration as a five-step cycle. *Biochemical Society Symposium* **65**, 233-243
- Shen, M. M. und Abate-Shen, C.** (2003): Roles of the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Developmental Dynamics* **228**, 767-778
- Sherman, L., Sleeman, J. P., Hennigan, R. F., Herrlich, P. und Ratner, N.** (1999): Overexpression of activated neu/erbB2 initiates immortalization and malignant transformation of immature Schwann cells in vitro. *Oncogene* **18**, 6692-6699
- Siegel, R., Naishadham, D. und Jemal, A.** (2012): Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **62**, 10-29
- Silverman, R. H.** (2003): Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry* **42**, 1805-1812
- Simard, J., Dumont, M., Soucy, P. und Labrie, F.** (2002): Perspective: prostate cancer susceptibility genes. *Endocrinology* **143**, 2029-2040
- Sobel, R. E. und Sadar, M. D.** (2005): Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 2. *The Journal of Urology* **173**, 360-372
- Stallmach, A., von Lampe, B., Matthes, H., Bornhoft, G. und Riecken, E. O.** (1992): Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation. *Gut* **33**, 342-346
- Stam, J. C., Sander, E. E., Michiels, F., van Leeuwen, F. N., Kain, H. E., van der Kammen, R. A. und Collard, J. G.** (1997): Targeting of Tiam1 to the plasma membrane requires the cooperative function of the N-terminal pleckstrin homology domain and an adjacent protein interaction domain. *The Journal of biological chemistry* **272**, 28447-28454
- Statistisches-Bundesamt** (2010): Todesursachen in Deutschland 2010.1
- Stetler-Stevenson, W. G. und Yu, A. E.** (2001): Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Seminars in Cancer Biology* **11**, 143-152
- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. und Katsuki, M.** (1998): Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* **17**, 3427-3433

- Sulciner, D. J., Irani, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Goldschmidt-Clermont, P. und Finkel, T.** (1996): rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 7115-7121
- Sun, D., Xu, D. und Zhang, B.** (2006): Rac signaling in tumorigenesis and as target for anticancer drug development. *Drug Resistance Update* **9**, 274-287
- Tao, W. J., Lin, H., Sun, T., Samanta, A. K. und Arlinghaus, R.** (2008): BCR-ABL oncogenic transformation of NIH 3T3 fibroblasts requires the IL-3 receptor. *Oncogene* **27**, 3194-3200
- Trachtenberg, J. und Blackledge, G.** (2002): Looking to the future: Advances in the management of hormone-refractory prostate-cancer. *Eur Urol Suppl.* **1**, 44-53
- Uhlenbrock, K., Eberth, A., Herbrand, U., Daryab, N., Stege, P., Meier, F., Friedl, P., Collard, J. G. und Ahmadian, M. R.** (2004): The RacGEF Tiam1 inhibits migration and invasion of metastatic melanoma via a novel adhesive mechanism. *J Cell Sci* **117**, 4863-71
- UICC** (2010): TNM Classification of Malignant Tumours, seventh edition
- Van Aelst, L. und D'Souza-Schorey, C.** (1997): Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development* **11**, 2295-2322
- van Leeuwen, F. N., van der Kammen, R. A., Habets, G. G. und Collard, J. G.** (1995): Oncogenic activity of Tiam1 and Rac1 in NIH3T3 cells. *Oncogene* **11**, 2215-2221
- van Zijl, F., Krupitza, G. und Mikulits, W.** (2011): Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* **728**, 23-34
- Vogelstein, B. und Kinzler, K. W.** (1993): The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics* **9**, 138-141
- Wagener, C. und Müller, O.** (2010): Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte. Stuttgart, Thieme
- Weinel, R. J., Rosendahl, A., Pinschmidt, E., Kisker, O., Simon, B. und Santoso, S.** (1995): The alpha 6-integrin receptor in pancreatic carcinoma. *Gastroenterology* **108**, 523-532
- Wennerberg, K. und Der, C. J.** (2004): Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of cell science* **117**, 1301-1312
- Wennerberg, K., Ellerbroek, S. M., Liu, R. Y., Karnoub, A. E., Burrridge, K. und Der, C. J.** (2002): RhoG signals in parallel with Rac1 and Cdc42. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 47810-47817
- Westwick, J. K., Lambert, Q. T., Clark, G. J., Symons, M., Van Aelst, L., Pestell, R. G. und Der, C. J.** (1997): Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 1324-1335
- Yu, S., Wang, M. W., Yao, X. und Chan, F. L.** (2009): Establishment of a novel immortalized human prostatic epithelial cell line stably expressing androgen receptor and its application for the functional screening of androgen receptor modulators. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **382**, 756-761

Ziober, B. L., Lin, C. S. und Kramer, R. H. (1996): Laminin-binding integrins in tumor progression and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* **7**, 119-128

Zynger, D. L. und Yang, X. (2009): High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia of the Prostate: The Precursor Lesion of Prostate Cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* **2**, 327-338

VIII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Engers für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas und die Erstellung des Erstgutachtens. Ich danke ihm herzlich für seine hervorragende Betreuung und Unterstützung.

Herrn PD Dr. Reza Ahmadian danke ich sehr für das Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Helmut E. Gabbert danke ich für die Möglichkeit zur Promotion im Forschungslabor seines Instituts für Pathologie.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Slava Ziegler und Frau Dr. Michèle Hoffmann, die mich beide über einen sehr langen Zeitraum dieser Arbeit mit großem Engagement unterstützt und betreut haben.

Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Sandra und Eva für ihre Hilfsbereitschaft und Geduld bedanken. Besonderer Dank gilt außerdem allen technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe Prof. Engers für ihre Unterstützung bei der Durchführung meiner Untersuchungen. Die vielen lustigen und schönen Momente innerhalb und außerhalb des Instituts mit Eva, Friederike, Michèle, Sandra, Slava und allen anderen werde ich nicht vergessen.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, meinem Freund und meiner restlichen Familie für ihre große Unterstützung. Ohne ihre grenzenlose Geduld, ihren liebevollen Zuspruch von Anfang an sowie ihr Motivationstalent wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke!

IX. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

Neuss, den 29. März 2016 Anne Fiederling