

"Einfluss von Rac1, Rac1b und TGF β auf MAP-Kinasen, AKT und Zytoskelettproteine in humanen Lungenadenokarzinomzellen"

Inauguraldissertation

zur Erlangung eines

Doktorgrades der Medizin

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von:

Laura Scharlibbe aus Kiel

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinik für Innere Medizin

Gutachter: Prof. Dr. Andre Menke
Gutachter: Prof. Dr. Günter Lochnit
Tag der Disputation: 29.11.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lungenkarzinom.....	1
1.2	Transforming growth factor β – TGF β	4
1.3	Rac1 und die alternative Spliceform Rac1b	6
1.4	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen MAPK und AKT	10
1.4.1	jun-N-terminale Kinase JNK	11
1.4.2	p38-Kinase	11
1.4.3	ERK-Signalweg	12
1.4.4	AKT-Signalweg.....	12
1.5	Vimentin, Paxillin und β -Aktin – eine kurze Übersicht.....	14
1.6	Ziele der Arbeit	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Materialien.....	16
2.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.2	Laborgeräte	16
2.1.3	Chemikalien.....	17
2.1.4	Software	18
2.1.5	Prokaryontische und eukaryontische Zellen.....	18
2.1.6	Molekularbiologische Kits	19
2.1.7	Standardisierte Puffer und Lösungen	19
2.1.8	Verwendete Antikörper	21
2.1.9	Standards	22
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Zellkultivierung	22
2.2.2	Passagieren der Zellen	23
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl mittels Hämatocytometer	23
2.2.4	Kryokonservierung von Zellen.....	23
2.3	Proteinbiochemische Verfahren	24
2.3.1	Proteinlysatherstellung	24

2.3.2	Photometrische Proteinbestimmung	24
2.3.3	SDS- Gelelektrophorese	25
2.3.4	Proteintransfer mittels Westernblot	26
2.3.5	Proteinnachweis mittels Immunfluoreszenz	27
2.3.6	Densitometrische Auswertung.....	27
2.4	Transfektion.....	28
2.4.1	Transiente Transfektion	28
2.4.2	Stabile Transfektion.....	29
2.4.3	Stimulation mit TGF β	30
2.2.4	Mikrobiologische Methoden.....	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Transfektionsversuche mit EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b in HCC44 und H23-Zellen.....	32
3.2	Effekte von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf MAP-Kinasen und AKT in HCC44.....	36
3.2.1	Effekt von Rac1 und Rac1b auf die JNK-Phosphorylierung in HCC44-Zellen	37
3.2.2	Effekt von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die ERK-Phosphorylierung in HCC44-Zellen	38
3.2.3	Effekt von Rac1 und Rac1b auf die p38-Phosphorylierung in HCC44-Zellen.....	39
3.2.4	Effekt von EGFP-Rac1/-Rac1b auf die Phosphorylierung von AKT in HCC44-Zellen	40
3.3	Effekt einer TGF β -Stimulation auf MAP-Kinasen und AKT in HCC44-Zellen	41
3.3.1	Effekt der TGF β -Stimulation auf die Kinase JNK in HCC44-Zellen	42
3.3.2	Effekt der TGF β -Stimulation auf ERK2 in HCC44-Zellen	45
3.3.3	Effekt der TGF β -Stimulation auf die MAPK p38 in HCC44-Zellen	47
3.3.4	Effekt der TGF β - Stimulation auf AKT in HCC44-Zellen	49
3.4	Effekte von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf MAP-Kinasen und AKT in H23-Zellen.....	53

3.4.1	Effekt von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die MAP-Kinase ERK in H23-Zellen.....	53
3.4.2	Effekt von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die Aktivität der Kinase p38 in H23-Zellen.....	54
3.4.3	Effekt von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf AKT in H23-Zellen.....	54
3.5	Effekt der TGF β -Stimulation auf die Aktivität der MAP-Kinasen und AKT in H23-Zellen.....	57
3.5.1	Effekt der TGF β -Stimulation auf die Aktivität der MAP-Kinase ERK in H23-Zellen.....	57
3.5.2	Effekt der TGF β -Stimulation auf die Aktivität der MAP-Kinase p38 in H23-Zellen.....	59
3.5.3	Effekt der TGF β -Stimulation auf die Aktivität der Kinase AKT	61
3.6	Auswirkungen der stabilen Transfektion mit pEGFP-Rac1/-Rac1b auf die Kinasen p38 und AKT in HCC44-Zellen.....	64
3.6.1	Auswirkung der dauerhaften Überexpression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die Aktivität der Kinase AKT	65
3.6.2	Auswirkung der dauerhaften Expression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die Kinase p38.....	66
3.7	Auswirkung von EGFP-Rac1, EGFP-Rac1b und TGF β auf Paxillin, Vimentin und β -Aktin in HCC44-Zellen.....	67
3.7.1	Auswirkung der transienten Transfektion mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf Paxillin.....	68
3.7.2	Auswirkung der transienten Transfektion mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf Vimentin.....	69
3.7.3	Auswirkung der transienten Transfektion mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf β -Aktin	71
3.8	Auswirkungen der stabilen Transfektion mit pEGFP, pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf die Proteine Paxillin, Vimentin und β -Aktin	72
3.8.1	Auswirkungen der stabilen Transfektion von EGFP-Rac1/-Rac1b auf Paxillin.....	72
3.8.2	Auswirkungen der stabilen Transfektion von HCC44-Zellen mit pEGFP-Rac1/-Rac1b auf Vimentin	72

3.8.3	Auswirkungen der stabilen Transfektion von EGFP-Rac1/-Rac1b auf β -Aktin	73
4	Diskussion	74
4.1	Rac1 und Rac1b als mögliche <i>upstream</i> -Regulatoren von MAP-Kinasen und AKT	74
4.1.1	Effekt von EGFP-Rac1/ -Rac1b auf JNK.....	74
4.1.2	Effekt von EGFP-Rac1/ -Rac1b auf p38	75
4.1.3	Effekt von EGFP-Rac1/ -Rac1b auf ERK	76
4.1.4	Effekt von EGFP-Rac1/ -Rac1b auf AKT	78
4.2	Einfluss von TGF β auf MAP-Kinasen und AKT in EGFP-Rac1/-Rac1b-überexprimierenden Zellen.....	79
4.2.1	Einfluss der TGF β -Stimulation auf JNK.....	80
4.2.2	Einfluss der TGF β -Stimulation auf p38	81
4.2.3	Einfluss der TGF β -Stimulation auf AKT und ERK	82
4.3	Überexpression von EGFP-Rac1/-Rac1 und TGF β -Stimulation als Einflussfaktoren auf die Proteinmenge von Paxillin, Vimentin, β -Aktin	83
4.3.1	Änderung der Vimentinmenge unter Einfluss von Rac1/Rac1b und TGF β	83
4.3.2	Änderung der Paxillinmenge unter Einfluss von Rac1/Rac1b und TGF β	85
4.3.3	Änderung der β -Aktinmenge unter Einfluss von Rac1/Rac1b und TGF β	87
4.4	Rac1: Ein neuer Therapieansatz?	87
5	Zusammenfassung	89
6	Abstract	90
7	Abkürzungsverzeichnis	91
8	Abbildungsverzeichnis	94
9	Tabellenverzeichnis.....	96
10	Erklärung zur Dissertation.....	97
11	Danksagung	98
12	Literaturverzeichnis.....	99

1 Einleitung

1.1 Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom gehört in Deutschland zu den häufigsten Krebsarten bei Männern und Frauen. Bei Männern ist es nach dem Prostatakarzinom das zweithäufigste Karzinom und bei Frauen das dritthäufigste nach dem Mamma- und Kolorektalen Karzinom. Im Jahr 2015 hat das Lungenkarzinom das Mammakarzinom bei Frauen als häufigste Krebstodesursache (15%) abgelöst. Bei Männern bleibt es mit 25% die häufigste Krebstodesursache (Krebs in Deutschland, 2018).

Die altersstandardisierten Neuerkrankungs- und Sterbekurven entwickeln sich bei den Geschlechtern gegenläufig. Bei Frauen steigt seit dem Ende der 1990er Jahre die Kurve für Lungenkrebsneuerkrankungen und die Sterberate. Die Zahlen bei den Männern zeigen eine sinkende Tendenz auf. Aktuelle Zahlen bezüglich der weltweiten Häufigkeit an registrierten Krebserkrankungen liefert die WHO Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). 2018 wurden weltweit 18,08 Millionen neue Krebserkrankungen diagnostiziert, davon war der Lungenkrebs mit 2,09 Millionen neuer Krankheitsfälle die häufigste Krebsart. 2013 starben in Deutschland 29560 Männer und 15524 Frauen an Lungenkrebs (Leitlinienprogramm Onkologie 2018). Bei Männern ist Lungenkrebs weiterhin die häufigste Krebsform und bei Frauen nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste Krebserkrankung (Mattiuzzi und Lippi 2019). Diese Entwicklung ist auf die veränderten Rauchgewohnheiten vor allem bei den Frauen seit den 1970er Jahren zurückzuführen (Bertz 2010). „*If women smoke like men, they die like men.*“ (Richard Peto in Pirie et al. 2013).

Die Zigarettenrauchinhalation ist für 85% der Lungenkarzinome verantwortlich. Die Dauer und das Ausmaß des Zigarettenkonsums bestimmen das Lungenkrebsrisiko. Entscheidend für das Krebsrisiko sind die Packungsjahre „*pack years*“ (Herold, 2015; Simonato et al. 2001). Bei 40 Packungsjahren besteht ein 10-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko. Auch Passivrauchen erhöht das Lungenkrebsrisiko um den Faktor 1,3-2. Berufliche Karzinogene, unter die Asbestverbindungen, Chrom VI-Verbindungen, Nickelmetalle, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und ionisierende Strahlen wie Radon fallen, sind für 5% der Lungenkarzinome verantwortlich. Weitere Karzinogene sind umweltbedingt wie z.B. Dieselabgase, Radon in Wohnräumen und das Passivrauchen. Bei Personen, deren Eltern

an Lungenkrebs erkrankt sind, ist eine genetische Prädisposition zu erkennen. Das Risiko selbst an Lungenkrebs zu erkranken, ist bei dieser Personengruppe um das 2-3-fache erhöht (Herold, 2015; Malhotra et al. 2016; Larsen und Minna 2011). Histologisch unterscheidet man zwei Arten:

1. Kleinzelliges Lungenkarzinom „*small cell lung cancer*“ SCLC

Dieses liegt in 15% der Fälle vor. Das SCLC hat vor allem aufgrund seiner frühen Metastasierung eine schlechte Prognose und ist in 80% bei Diagnosestellung bereits metastasiert. Die Tumorverdopplungszeit beträgt beim SCLC 10-50 Tage.

2. Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom „*non-small cell lung cancer*“ NSCLC

Das NSCLC ist die häufigere Form des Lungenkarzinoms mit 85% an der Gesamthäufigkeit. Man unterscheidet hier vor allem zwischen Adenokarzinom (35%), Plattenepithelkarzinom (40%) und Großzelligem Lungenkarzinom (10%). Die Tumorverdopplungszeit beträgt 300 Tage beim Plattenepithelkarzinom und 180 Tage beim Adenokarzinom. Das Adenokarzinom ist die häufigste Lungenkarzinomform bei Nichtrauchern (Herold et al. 2015, Kadara et al. 2012; Larsen und Minna 2011).

Im Frühstadium der Erkrankung gibt es keine typischen Erkrankungszeichen, sodass die Patienten oft erst im Spätstadium vorstellig werden, wenn es bereits zu Metastasierungen gekommen ist. Das Lungenkarzinom metastasiert lymphogen in die Lungen- und Mediastinallymphknoten und hämatogen in Leber, Gehirn, Nebennieren und Skelett (Herold et al. 2015).

Die Therapieansätze sind sehr umfangreich und richten sich nach Entität des Tumors sowie nach dem TNM-Stadium. Die Therapien beinhalten operative Maßnahmen, (neo-) adjuvante Bestrahlung, Radiochemotherapie oder Chemotherapie. Neue Therapiemethoden bestehen beim kleinzelligen Bronchialkarzinom in der sogenannten Target-Therapie und den Immun-Checkpoint-Inhibitoren. In der Target-Therapie kommen gegen Mutationen des Tumors gerichtete Antikörper ins Spiel. Unter diese Mutationen fallen z.B. Mutationen im EGFR oder VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)-Signalweg (Herold et al. 2015, Leitlinienprogramm Onkologie 2018).

Die Krebszelle ist gekennzeichnet durch eine Ansammlung von genetischen Veränderungen. Sie entstehen unter Einfluss von Kanzerogenen (s.o.) oder aufgrund genetischer Prädisposition aus gesunden Zellen. Es gibt sechs Kennzeichen, die in Zellen zu Tumorwachstum führen und eine Metastasierung der Tumorzellen ermöglichen (Hanahan und Weinberg 2011):

1. Unabhängigkeit von Proliferationssignalen: Gesunde Zellen werden in ihrem Wachstum und Proliferation von Wachstumsfaktoren gesteuert. Die Proliferation maligner Zellen findet unabhängig dieser Einflüsse statt. Durch Mutationen entstehen ständig aktivierte Kinasen oder es gehen negative *Feedback-Loops* zur Proliferationskontrolle verloren.
2. Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren: Tumorsuppressorgene limitieren das Zellwachstum und die Zellproliferation. Zu den Prototypen der Tumorsuppressorgene gehören das RB-(Retinoblastom) und p53-Protein. Diese erhalten unterschiedliche Signale und Informationen über den Zustand der Zelle oder deren Umgebung. Sie entscheiden durch Zusammenschau der Informationen über die Progression im Zellzyklus und den Übertritt in die nächste Phase des Zellzyklus. Durch Mutationen in diesen Genen oder deren Verlust werden die Zellen befähigt, trotz beispielsweise DNA-Schäden den Zellzyklus weiter zu durchlaufen.
3. Resistenz gegenüber dem apoptotischen Zelltod: Die Krebszellen reagieren nicht mehr auf proapoptotische Signale und entgehen so dem programmierten Zelltod.
4. Unbegrenztes Wachstumspotenzial: Über die Telomere wird in gesunden Zellen reguliert, wie oft sich diese teilen können. In Krebszellen ist dieser limitierende Faktor durch die Hochregulation der Telomereexpression außer Kraft gesetzt.
5. Angiogenese: Damit der Tumor wachsen kann, benötigt er Sauerstoff und die Stoffwechselmetabolite müssen abtransportiert werden. Dies kann nur durch die Bildung von Blutgefäßen erreicht werden. Durch hypoxische Bedingungen werden spezifische Onkogene wie u.a. VEGF induziert und in der Folge Blutgefäße zur Tumorversorgung gebildet.
6. Metastasierung und Invasion: Damit sich der Tumor in der extrazellulären Matrix (EZM) ausbreiten kann, müssen die Zellen über Proteasen verfügen, die die Kollagenfasern zerstören können. Des Weiteren müssen sich die Zellen voneinander lösen können. Das geschieht durch den Verlust von Zell-Zelladhäsionsproteinen wie z.B. E-Cadherinen. Weiterhin werden Epithelzellen durch die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) zur Dissemination und Invasion in Gewebe befähigt.

Unter Punkt 2 fällt auch die Beeinflussung der Proliferation und des Wachstums durch den *Transforming growth factor β* (TGF β). TGF β hat in der frühen Phase der Tumorentstehung eine antiproliferative Wirkung auf die Zellen. In dem Spätstadium des Tumors ist TGF β

jedoch dadurch gekennzeichnet, dass es die Proliferation anregt und zu einer erhöhten Invasivität und einer Zunahme der EMT führt (Leivonen und Kähäri 2007).

Bereits in *in-vivo* und *in-vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass Rho-GTPasen an der Signalweiterleitung und an der Tumorbildung beteiligt sind. In vielen Tumorarten kommt es zu Deregulation der GTPasen. Diese Deregulation ist beispielsweise mit der Umwandlung einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle oder der Metastasierung von Tumorzellen verbunden (Porter et al. 2016). Eine Überexpression der GTPase Rac1 konnte in Hoden-, Magen-, Brust-, Prostata- und Lungenkarzinomen nachgewiesen werden (Kamai et al. 2004, Fritz et al. 2002, Engers et al. 2007). Neben Rac1 existiert die alternative Splicevariante (s.u.) Rac1b, welche in Brust- und Kolonkarzinomen in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden konnte (Schnelzer et al. 2000). Das Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen welche Auswirkung die Überexpression von Rac1 und Rac1b auf die Signalweiterleitung über ERK, p38, JNK und AKT hat. Außerdem wurde der Effekt der Überexpression auf Proteine des Aktinzytoskeletts und fokaler Adhäsionen beleuchtet. Des Weiteren wurde betrachtet, ob sich eine Stimulation mit TGF β auf die Aktivität oben genannter Kinasen auswirkt.

1.2 Transforming growth factor β – TGF β

Der *Transforming growth factor β* (TGF β) gehört zu der Familie der Wachstumsfaktoren. Zu der TGF β -Familie gehören TGF β 1-3, Activine, Inhibine, knochenmorphogenetische Proteine (*bone morphogenetic proteins, BMP*) und weitere Zellwachstums- und Zelldifferenzierungsfaktoren. TGF β besitzt sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Eigenschaften (Wakefield und Roberts 2002; Leivonen und Kähäri 2007). Unter die tumorsuppressiven Faktoren fallen: Beeinflussung der Apoptose, der Zellintegrität und Inhibition des Zellwachstums. Zu den onkogenen Eigenschaften gehören die Induktion der Zellproliferation, eine erhöhte Invasivität und Motilität der Zellen (Leivonen und Kähäri 2007). In Bezug auf die erhöhte Motilität durch TGF β wurde gezeigt, dass TGF β zur Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) in vielen epithelialen Tumoren beiträgt (Miyazono et al. 2018).

Die Rezeptoren, über die TGF β wirkt, bestehen aus einer Ligandenbindungsdomäne, einer transmembranären Domäne und einer cytosolischen Domäne. Der Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus TGF β -Rezeptor Typ I und Typ II. Anstatt einer Tyrosinkinase besitzt der Rezeptor Typ I eine Serin-/Threonin-Kinase. Nach der Bindung von TGF β an

den Rezeptor Typ II verbindet sich dieser mit Rezeptor Typ I phosphoryliert und aktiviert die Serin/Threonin-Kinase. Das Signal kann über dem SMAD-abhängigen Signalweg weitergeleitet werden oder über die Aktivierung von MAP-Kinasen bzw. AKT (Giehl et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass in der Mehrheit der kolorektalen Karzinome Mutationen im TGF β -Rezeptor II und in fast der Hälfte aller Pankreaskarzinome Mutationen des Smad 4 Genes vorliegen. Diese Mutationen führen dazu, dass die inhibierende Wirkung TGF β s auf das Zellwachstum verloren geht und dies zum unkontrollierten Zellwachstum führen kann (Weinberg, 2014). TGF β ist in die Aktivierung von kleinen Rho-GTPasen involviert. Es konnte eine Aktivierung von Rac1, Cdc42 und RhoA gezeigt werden. Wobei RhoA bislang den wichtigsten Effektor darstellt, da es das *serum-response-element* unabhängig von Smad aktiviert und so auf die Genregulation Einfluss nehmen kann (Giehl et al. 2007, Derynck und Zhang 2003). In Abbildung 1 sind die vorab erwähnten Signalwege zur Übersicht skizziert.

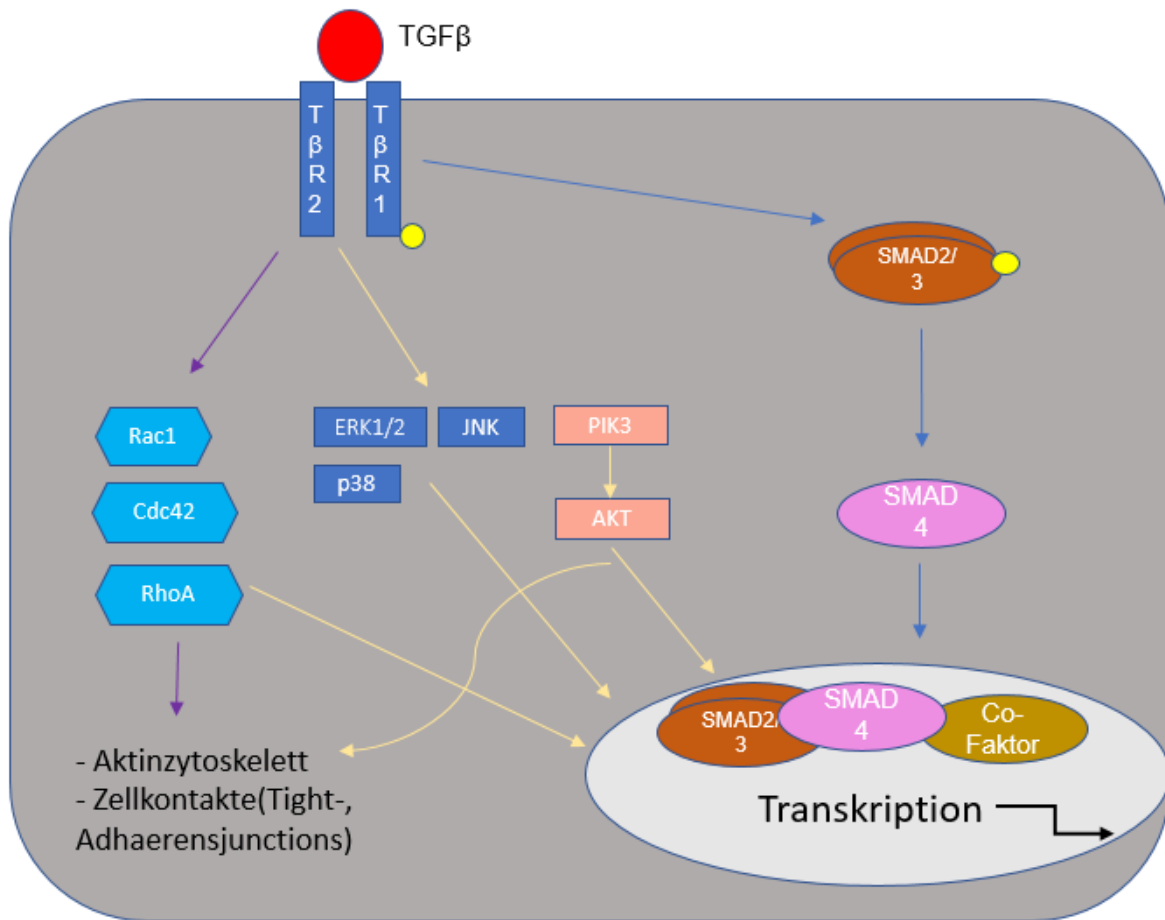


Abbildung 1: TGFβ Signalwege adaptiert nach Derynck, R.; Muthusamy, B. P.; Saeteurn, K. Y., 2014

Das Schaubild zeigt vereinfacht die Signalwege, die durch TGFβ aktiviert werden. Der Rezeptor Typ II bindet an den Rezeptor Typ I und aktiviert dessen Serin/Threonin-Kinase. Die Kinase phosphoryliert u.a. Smad2/3. Der Komplex, in diesem Falle aus Smad2/3 bestehend, bindet an Smad4. Das Trimer wird in den Zellkern (hellgraue Ellipse) transloziert und bindet mittels Cofaktoren an die DNA zur Regulierung der Transkription. Linksseitig sind die Smad-unabhängigen Signalwege dargestellt. TGFβ kann auch zur Aktivierung von MAP-Kinasen wie ERK1/2, JNK, p38, PI3K führen, die wiederum auch die Transkription von Genen beeinflussen. Die Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und vor allem RhoA sind ebenfalls Effektoren von TGFβ. Über ihre Aktivierung kommt es zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts und Induktion der Bildung fokaler Zellkontakte.

1.3 Rac1 und die alternative Spliceform Rac1b

Rac1 gehört zur Familie der Rho-Proteine. Die Rho-Proteine gehören zu der Ras Superfamilie. Die am besten untersuchten Rho-Proteine sind RhoA, Cdc42 und Rac1. Rho-GTPasen wechseln zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand. Der Wechsel von GTP zu GDP wird über die membranständigen *Guanine exchange factors* (GEFs) katalysiert. Die Hydrolyse von GTP zu GDP erfolgt durch die intrinsische GTPase Domäne, reguliert durch GTPase aktivierende

Proteine (GAP). Eine weitere Kontrollstelle bildet der *Rho-Guaninnucleotid-Dissoziation-Inhibitor* (GDI). Dieser bindet die Rho-GTPase, sodass diese nicht aktiviert werden kann und überführt diese in das Zytosol (Ridley 2001).

Die Rac-Untergruppe besteht aus Rac1, Rac1b, Rac2 und Rac3. Diese besitzen eine Ähnlichkeit von 90% untereinander. Modifikationen im C-Terminus bedingen deren Membranassoziationen, Proteininteraktionen und deren Lokalisation im Zytosol. Rac1 besitzt eine c-terminale Geranylierung sowie Farnesylierung. Aufgrund zahlreicher basischer Aminosäuren wird es vor allem an cholesterolreichen Arealen in der Membran verankert (Nimnual et al. 2010). Rac1 kommt in allen Zellen ubiquitär vor. Eine Überexpression der Rho-GTPase konnte in Brust-, Magen-, Hoden-, nicht-kleinzelligen Lungen- und oralen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden (Chen et al., 2011). Diese Überexpression geht beispielsweise in NSCLC mit einer erhöhten nodalen Metastasierung und einem höheren TNM-Stadium einher (Chen et al., 2011). Es hat ein Molekulargewicht von 26,5kDa. Rac2 findet man nur in hämatopoetischen Zellen. Es wurde gezeigt, dass Rac2 vor allem für die Aktivierung der NADPH-Oxidase verantwortlich ist. Rac3 wird vor allem im Gehirn exprimiert (Nimnual et al. 2010). Rac1b ist die alternative Spliceform von Rac1. Es unterscheidet sich von Rac1 durch eine *In-Frame*-Insertion von Exon 3b hinter der Switch II Domäne. Die Switch I und Switch II Domänen bilden die Region, die bei dem Austausch von GTP zu GDP ihre Konformation ändern. Aufgrund der Insertion besitzt Rac1b 57 zusätzliche Nukleotide, die für 19 Aminosäuren kodieren (Parri und Chiarugi 2010). Die C-terminale Insertion bewirkt, dass Rac1b durchweg im aktivierten Zustand vorliegt. Es hat eine erhöhte Guaninnukleotid-Austauschrate, aber dahingegen eine verminderte Aktivität der intrinsischen GTPase. Zudem kann Rac1b nicht mit Rho-GDIs interagieren, sodass es nicht in das Zytosol überführt werden kann (Parri und Chiarugi 2010; Raftopoulou und Hall 2004). Zu den am meisten erforschten Eigenschaften von Rac1 gehört die Mitwirkung bei der Zellmigration.

Neben Rac spielen noch die Rho-GTPasen RhoA und Cdc42 eine Rolle bei der Regulation der Zellmotilität und den Migrationsvorgängen von Zellen. Migration von Zellen ist ein wichtiger Faktor bei der embryonalen Entwicklung oder als Antwort auf Infektionen, bei der Wundheilung oder bei chronischen Erkrankungen wie Krebs, Arteriosklerose und rheumatischen Erkrankungen. Zellen haben verschiedene Modi, in denen sie migrieren können. Zum einen als Zellverband in Zellsträngen oder Zellclustern, zum anderen als Einzelzelle, die sich amöboid oder mesenchymal fortbewegt (Devreotes und Horwitz 2015). Das Prinzip der Zellmigration kann auf vier Prinzipien reduziert

werden: Zuerst werden ein Lamellipodium und neue fokale Zelladhäsionskontakte gebildet. Beide Mechanismen werden über Rac1 reguliert. Danach kommt es Rho-vermittelt zur Kontraktion der Aktinmyosinfasern und zum Ablösen des Zellschwanzes, sodass eine zielgerichtete Bewegung der Zelle möglich ist. Ich möchte die Rac1 vermittelten Zellreaktionen näher beleuchten. Lamellipodien sind breite Zellausstülpungen an der *Leading edge* der Zelle. Diese bestehen vornehmlich aus einem Aktinfasernetzwerk. Die Aktinpolymerisation in den Lamellipodien wird über die Rho-GTPase Rac1 gesteuert. Rac1 wird über Zytokine, Wachstumsfaktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix zur Lamellipodienbildung aktiviert (Sit und Manser 2011; Parri und Chiarugi 2010; Raftopoulou und Hall 2004). Nach der Aktivierung induziert Rac1 die Lamellipodienbildung über die Aktivierung des Insulin-Tyrosinkinase-Rezeptor-Substrats p53 (IRS p53), welches über eine SH-Domäne mit dem WAVE-Protein, einem zu der Wiskott-Aldrich Syndrom Proteine zugehörigen Protein, interagiert und so den Arp 2/3 Komplex aktiviert. Der Arp 2/3 Komplex fördert die Aktinpolymerisation, indem es an freien Aktinenden die Polymerisation aktiviert, um so ein verzweigtes Aktinnetz auszubilden (Kazazian et al. 2017; Raftopoulou und Hall 2004). Rac1 aktiviert GTP-vermittelt die Phosphatidylinositol 4-Phosphat-5-Kinase (PIP 5 Kinase), welche über den Transfer einer Phosphatgruppe die Bildung von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PtdIns (4,5) P₂) fördert. PtdIns (4,5) P₂ bindet an die *Capping*-Proteine der *barbed ends* des Aktins und entfernt diese. An diesen ungeschützten Enden können nun Aktinmonomere anheften und zur Aktinpolymerisation führen (Tolias et al. 2000; Tolias und Carpenter 2000). Nach der Bildung der Lamellipodien muss sich die Zelle in der extrazellulären Matrix fortbewegen. Um dies zu erreichen, werden die Kollagenfasern der EZM mittels Matrixmetalloproteasen (MMP) gespalten. Neben der Bildung von Lamellipodien muss in der Vorderflanke der Zelle der Umsatz der fokalen Adhäsionskontakte reguliert werden. Die Adhäsionskontakte müssen nach der Zellbewegung die Zelle neu in der EZM verankern. Um die Verankerung zu gewähren, aktiviert Rac1 die Serin/Threonin Kinase p65PAK, die die Integrin-abhängige Zelladhäsion mit Hilfe von PIX und GTI1 reguliert. Über die Aktivierung von p65PAK wird zudem noch die Phosphorylierung der LIM Kinase reguliert, die über Phosphorylierung das Protein Cofilin inhibiert und so zur Aktinpolymerisation führt. Cofilin bindet an globuläres (G-) und filamentäres (F-) Aktin und fördert an den negativ geladenen Aktinenden die Depolymerisation und Instabilität von Aktin (Raftopoulou und Hall 2004).

Wie anfangs beschrieben, wird Rac1 multifaktoriell aktiviert. Während der Zellmigration gibt es zwei wichtige Signalwege über die Rac1 als nachgeschalteter Effektor über G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird. Zum einen steht die Aktivierung von Rac1 in Zusammenhang mit der Phosphoinositol 3-Kinase (PI 3-Kinase) und zum anderen mit dem Adapterproteinkomplex Crk/ DOCK180. Diese wurden vor allem in der *Leading edge* der Zelle bei der Lamellipodienbildung nachgewiesen (Raftopoulou und Hall 2004). Gezeigt werden konnte, dass die Kinase AKT Rac1 phosphoryliert und so die GTP-Bindung reduziert. Die Fokale-Adhäsions-Kinase (FAK) und Src phosphorylieren ebenfalls Rac1 in der Switch II-Domäne und führen so zur Inhibition der GTP-Bindung, sodass dies zu einem stabilisierenden Effekt auf die Integrität des Aktinzytoskeletts und auf die transmembranäre Adhäsion während der Zellmotilität führt (Chang et al. 2011).

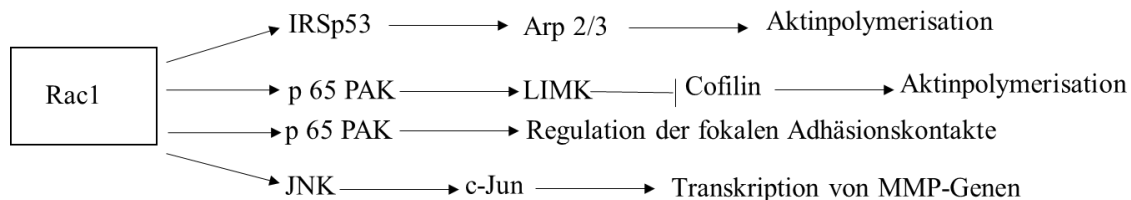


Abbildung 2: Effekte von Rac1

Rac1 kann als Rho-GTPase nachfolgende Effektoren stimulieren und aktivieren. So nimmt es Einfluss auf die Aktinpolymerisation in den Lamellipodien. Diese sind für die Zellmigration unabdingbar. Ebenso die über p65 PAK regulierte Inhibierung von Cofilin, welches bei Stimulation zur Aktindepolymerisation führt. Über die Phosphorylierung von JNK wird der Transkriptionsfaktor c-Jun aktiviert und reguliert im Zellkern die Transkription von Matrixmetalloproteasen. Rac1 stimuliert in Chondrozyten MMP1 und in Fibroblasten MMP9.

Rac1b ist, wie zu Beginn beschrieben die alternative Spliceform von Rac1. Im folgenden Abschnitt sollen Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Rac1 und Rac1b dargelegt werden. Rac1b konnte vor allem in Zellen von Kolon-, Brust-, Pankreas- und Lungenadenokarzinomen nachgewiesen werden (Singh et al. 2004, Stallings-Mann et al. 2012). Rac1b stimuliert nicht wie Rac1 die p21-aktivierte Kinase (PAK) und c-Jun-Kinase. Allerdings aktivieren beide Proteine NFκB, AKT und das ROS-System. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Rac1 die GTPase Rho und ROCK inhibieren kann (Mitchell et al. 2013). ROCK stimuliert die Formation von Aktinmyosinfilamenten und hat so Einfluss auf die Kontraktilität der Zelle, den Abbau von Zelladhäsionskontakten, die Tumordissemination und die Tumorangiogenese. Es wurde gezeigt, dass die Expression von Rac1b die Inhibierung von Rho durch Rac1 antagonisiert (Nimnual et al. 2010). Bei hoher Expressionsrate von Rac1b kommt es in den Zellen Rho-abhängig zu dauerhaften

Ausstülpungen der Zellmembran. Dies scheint die Invasivität der Zellen zu verstärken, da diese durch die Protrusionsbildungen befähigt sind durch die EZM zu migrieren (Nimnual et al. 2010). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Rac1b den Transfer von Rac1 in die Zellmembran zu blockieren scheint. Dies wurde dadurch erklärt, dass Rac1b nicht an RHO-GDI binden kann und daher konstitutiv membranständig ist, sodass die Bindungsstellen in der Membran für Rac1 durch Rac1b besetzt sind (Nimnual et al. 2010).

Stallings-Mann et al. konnten herausfinden, dass Rac1b im Stadium I und II des Lungenkarzinoms und als Antwort auf Zigarettenrauch verstärkt produziert wird (Stallings-Mann et al. 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass Rac1b in Lungenadenokarzinomzellen die EMT induziert und so zu Progression und Invasivität des Tumors führt. In den Rac1b- exprimierenden Lungenzellen wurden höhere Raten an Vimentin, Kollagen und glattmuskelspezifischen α -Aktin gefunden. Außerdem wurde ein Verlust an epithelialen Markern beschrieben (Stallings-Mann et al. 2012).

Die *In-Frame* Insertion von 19 Aminosäuren scheint Bindungsdomäne für Proteine zu sein, die dazu führen, dass die Zellen ihre epithelialen Zellstruktur verlieren, die Zell-Zell-Kontakte aufgelöst werden, wodurch sie vermehrt proliferieren und eine ausgeprägtere Migrationsfähigkeit erlangen. Zu den Proteinen gehören SmGDS, p120^{ctn} und RACK (Rezeptor für aktivierte C- Kinase1) (Orlichenko et al. 2010).

1.4 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen MAPK und AKT

MAP-Kinasen sind die Hauptregulatoren von Zellproliferation, Differenzierung, Zelltod, Migration, Invasion und Entzündungsreaktionen. Außerdem sind sie in die Vermittlung kurzfristiger Effekte auf die Homöostase und hormonaler Antworten involviert (Chen et al. 2001). Abweichende Regulationen des MAP-Kinase Wegs können zu Tumor- oder anderen chronischen Erkrankungen führen. Die MAP-Kinasen können in fünf Untergruppen gegliedert werden:

- a) ERK: ERK1/2
- b) c-Jun: N-JNK/ SAPK
- c) p38: p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ
- d) ERK: ERK3, ERK4
- e) ERK: ERK5

Der Signalweg setzt sich aus der Aktivierung der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) zusammen. Die Aktivierung der Signalwege erfolgt über mehrere Auslöser,

dazu gehören: Mitogene, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Tumornekrosefaktor α , Stress und UV-Licht. Die aktivierte Form phosphoryliert anschließend eine MAPKK. Die finalen Kinasen bilden die oben genannten Kinasen ERK1/2, p38 und JNK. MAP-Kinasen erfordern eine Threonin-Tyrosin Phosphorylierung. Als Kennzeichen der MAP-Kinasen gilt die Thr-XX-Tyr Domäne in der Aktivierungsschleife der Kinase. Die Inaktivierung erfolgt über spezifische Phosphatasen, die die Phosphate vom Serin/Threonin oder Tyrosin entfernen (Cargnello und Roux 2011)

In Kapitel 1.1 wurde unter anderem auf die genetische Komponente des Lungenkrebses hingewiesen. In 90% dieser Genmutationen ist die GTPase K-Ras betroffen. Diese ist dauerhaft aktiviert und führt dann zur Stimulation von Ras $\rightarrow$ Raf $\rightarrow$ MEK $\rightarrow$ MAPK. Aus diesem überaktivierten Signalweg resultiert eine vermehrte Zellproliferation sowie gesteigertes Zellwachstum. Im Gesamtüberblick über die Karzinome ist dieser Signalweg in 30% überaktiviert (Cargnello und Roux 2011, Lei et al. 2014).

1.4.1 jun-N-terminale Kinase JNK

Für JNK kodieren drei Gene: JNK1, JNK2 und JNK 3. JNK1 und JNK2 kommen ubiquitär vor, wobei JNK3 vornehmlich im Gehirn, in den Hoden und in Kardiomyozyten zu finden ist. JNK-Kinasen sind stressaktivierte Proteine. Sie werden über UV-Strahlung, Zytokine oder Agenzien, die mit der DNA oder den Proteinen interagieren, aktiviert (Lei et al. 2014). Die direkte Phosphorylierung von JNK geschieht über MKK7 und MKK4. Die JN-Kinase ist an der Zytokinproduktion, an Entzündungsreaktionen und an der Regulation des Immunsystems beteiligt. Außerdem gibt es eine Querverbindung zu der MAP-Kinase p38. Diese kann durch JNK aktiviert werden (Lei et al. 2014).

1.4.2 p38-Kinase

Die Gruppe der p38-Kinasen setzt sich aus vier Isoformen zusammen: p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ . Die Formen p38 α und p38 β werden ubiquitär in den Geweben exprimiert. Dahingegen findet man p38 γ vor allem im Skelettmuskel mit besonders hohen Konzentrationen bei der Muskelzelldifferenzierung. Die vierte Isoform p38 δ kommt in Lunge, Niere und endokrinen Organen vor (Lei et al. 2014). P38 gehört wie JNK zu den stressaktivierten Kinasen. Stimuli, die zur Aktivierung führen, sind: Hypoxie, UV-Strahlung, Inflammation, Ischämie, Interleukin1 (IL1) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) (Cargnello und Roux 2011). Die vorgeschalteten Kinasen, die zur dualen Phosphorylierung von Thr-Gly-Tyr führen, heißen MKK3/6 (Chen et al. 2001). So ist die p38 Kinase in die

Regulation des Zellüberlebens und Zelltods eingebunden. Eine wichtige Rolle spielt die Kinase bei malignen Lymphomen, Leukämie, Brust-, Prostata- und Lungenkarzinomen (Lei et al. 2014). In vielen Krebsarten ist die p38 vermittelte kontinuierliche Zellproliferation unabdingbar. Diese wird durch die Stimulation von nachgeschalteten Proteinen wie ATF-2 und Elk-1 erreicht. Das ATF-2 Protein bindet an c-Jun und stimuliert die CRE (*cAMP responsive element*) abhängige Transkription. Eine wichtige Rolle spielt p38 in der Regulation von proinflammatorischen Zytokinen durch die Modulation des Transkriptionsfaktors NFκB. Es greift auch über die Repression der Cyclinbildung und Stimulation von CDK-Inhibitoren negativ regulierend in den Zellzyklus ein (Cargnello und Roux 2011). Die tumorsuppressive Wirkung von p38 beruht auf der Aktivierung von p53 und der darüber stimulierten Apoptose.

1.4.3 ERK-Signalweg

ERK1/2 ist die am genauesten erforschte MAP-Kinase. ERK1 und ERK2 besitzen eine 83%-ige Übereinstimmung in ihren Aminosäuren. Sie werden in allen Geweben, vor allem im Skelettmuskel, Thymus und Gehirn exprimiert. Als Antwort auf Wachstumsfaktoren werden sie an der Thr-Tyr-Position phosphoryliert. Als Stimulanzen fungieren der *Platelet derived growth factor (PDGF)*, *epidermal growth factor (EGF)*, Insulin, oxidativer Stress, mikrotubuläre Desorganisation und Zytokine (Cargnello und Roux 2011). Das ERK1/2 Modell besteht aus der MAPKK A-Raf, B-Raf, Raf-1, der MAPKK MEK-1, MEK-2 und den MAPK ERK1 und ERK2. ERK1/2 ist beteiligt an der Zellproliferation und Differenzierung. Es treibt die Progression der G₁/S-Phase des Zellzyklus an. Neben ERK1/2 gibt es die Isoformen ERK3, ERK4 und ERK5. ERK3 ist ebenfalls an der Zellproliferation und Zellzyklusprogression beteiligt. Die Funktion von ERK4 ist bislang unbekannt. ERK5 wird durch oxidativen Stress und Wachstumsfaktoren in der frühen Embryonalentwicklung und vaskulären Genese aktiviert (Lei et al. 2014).

1.4.4 AKT-Signalweg

AKT beziehungsweise Proteinkinase B (PKB) ist eine seit bereits 25 Jahren bekannte und bereits auch gut erforschte Kinase (Manning und Toker 2017). Es gibt drei verschiedene Formen: AKT1, AKT2 und AKT3. Sie besitzen eine 80%-ige genetische Übereinstimmung untereinander und haben eine wichtige Rolle vor allem beim Tumorwachstum. Ein gut erforschter und bekannter Aktivator von AKT ist PI3K (Phosphoinositid 3-Kinase). Die Kinase PI3K ist in der Zellmembran lokalisiert. Dort wird PIP₃ generiert, welches dazu

führt, dass AKT an die Zellmembran transferiert wird. Dort kann es durch eine Pleckstrindomäne (PH) an PIP3 binden und über eine Aktivierung durch mTOR2 unterschiedlichste Effektoren wie GSK3, mTORc1, FOXO beeinflussen. Diese Interaktionen haben vor allem aktivierende Auswirkungen auf das Zellwachstum, das Überleben der Zellen und den Zellstoffwechsel (Manning und Toker 2017; Faes und Dormond 2015). In vielen Krebsarten konnte eine Deregulation des PI3K/AKT-Signalweges nachgewiesen werden. Mutationen in PI3K führen zu einer konstitutiv aktivierten Kinase und damit zur Aktivierung des gesamten Signalweges. In neueren Studien konnte auch gezeigt werden, dass es noch weitere und womöglich wichtigere Effektoren von PI3K innerhalb der Tumorgenese gibt. Unter diese fallen: Rac, TEC-Kinasen und der PDK1-mTOR2-SGK Signalweg (Lien et al. 2017).

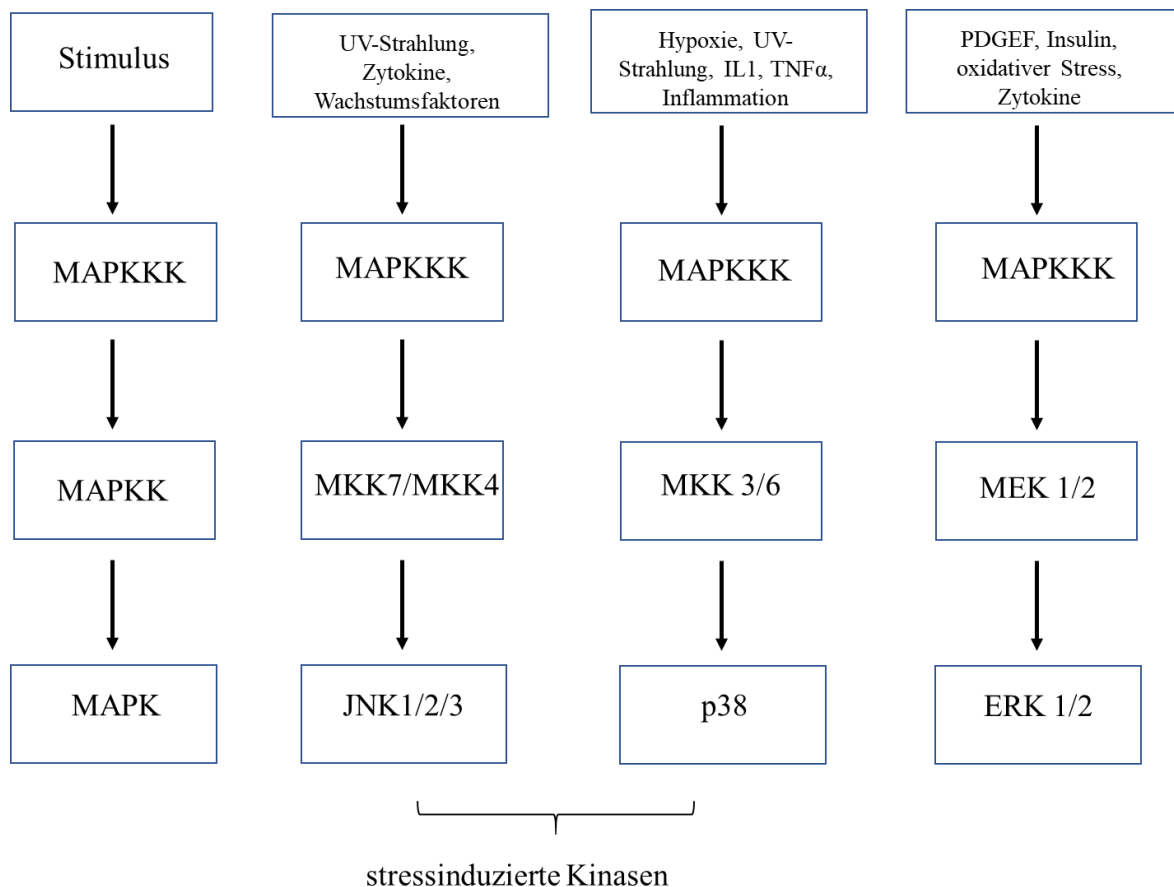


Abbildung 3: MAP-Kinasen-Signalwege

Diese Abbildung zeigt den schematischen Ablauf einer MAPK Signalkaskade. Von links nach rechts werden die Signalwege für JNK, p38 und ERK1/2 dargestellt. Aktivierend wirken u.a. Wachstumsfaktoren, Stress und Zytokine. Ganz links ist der allgemeine Signalweg über die MAPKKK, MAPKK, MAPK und die Aktivierung der Effektoren dargestellt. Für jedes Protein (ERK1/2, p38 und JNK) gibt es eigene Kinasen, die hier mit Eigennamen aufgezeichnet sind.

1.5 Vimentin, Paxillin und β -Aktin – eine kurze Übersicht

Vimentin gehört zu der Gruppe der Intermediärfilamente. Es ist ein 57 kDa schweres Protein und wird in den Mesenchymzellen, wie Fibroblasten, Zellen des Knochenmarks oder in Endothelzellen exprimiert (Sharma et al. 2019). Es ist ein wichtiges Protein des Zytoskeletts und spielt eine entscheidende Rolle zur Beibehaltung der Zellintegrität und der Gewebsintegrität. In Tumoren konnte Vimentin als wichtiges Markerprotein der EMT, welche entscheidend für die Metastasierung ist, nachgewiesen werden (Sharma et al. 2019; Kidd et al. 2014). Paxillin ist ein 68 kDa schweres fokales Adhäsionsprotein. Paxillin vereinfacht wie viele weitere Adapter- und Gerüstproteine die Weiterleitung von Signalen innerhalb der Zelle. Es kann über seine LIM-Domänen weitere Mediatoren rekrutieren.

Paxillin bildet außerdem eine Plattform, über die eine Verbindung mehrerer Signalwege stattfindet, sodass die Zelle sich schnell an äußere Reize anpassen kann. Die meisten dieser Signale sind G-Protein vermittelt. Dazu gehören unter anderem Rho, Rac1 und Cdc42. Die durch Paxillin weitergeleiteten Signale betreffen die Änderung oder Anpassung der Zellform und die Migration von Zellen (Brown und Turner 2004). Aktin ist enorm wichtig für eine Vielzahl physiologischer Prozesse in der Zelle. Darunter fallen Zellmotilität, Signaltransduktion, Beibehaltung der Zellform, Zelladhäsion und Muskelkontraktion (Simiczyjew et al. 2017). Zu der Gruppe der Aktine gehören sechs Isoformen. Es wird zwischen α -, β - und γ -Aktin unterschieden. α -Aktin ist in verschiedenen Muskelgeweben zu finden und β -, γ -Aktin sind als nicht-muskuläre Aktine in allen Zellen vorhanden und notwendig für das Zellüberleben (Vandekerckhove und Weber 1978; Simiczyjew et al. 2017)

1.6 Ziele der Arbeit

Die Arbeit wird sich mit zwei größeren Fragen beschäftigen. Zuerst soll geprüft werden, ob eine Überexpression von EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b zu einer Änderung in den oben genannten Signalkaskaden führt. Dabei werden insbesondere die unterschiedlichen Auswirkungen von Rac1 und seiner alternativen Spliceform Rac1b betrachtet. Außerdem stellt sich die Frage, ob eine Behandlung der Lungenkarzinomzellen mit TGF β eine Zu-, oder Abnahme der Phosphorylierung und somit Aktivierung oder Deaktivierung der Signalproteine bewirkt. Des Weiteren wird untersucht, inwieweit sich eine gleichzeitige Rac1-/Rac1b-Überexpression und TGF β -Stimulation auf die Singalproteine in HCC44- und H23-Zellen auswirkt.

Im Rahmen dieser Untersuchungen stellt sich die Frage, ob sich die Auswirkungen von Rac1 und Rac1b unterscheiden, wenn diese dauerhaft in den Zellen exprimiert werden. Dazu wurden stabile Zellklone etabliert und anhand dieser die Effekte der dauerhaften Expression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die Signalproteine untersucht.

Neben den MAP-Kinasen und AKT sind aber auch die Proteine Vimentin, Paxillin und β -Aktin von Interesse. Es wurden diese Proteine ausgewählt, da diese nachweislich an der Migration und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt sind. Die Hypothese ist, dass eine Überexpression von Rac1 oder Rac1b eine Auswirkung auf die Menge der Proteine in den Zellen hat. Dazu werde die Menge der oben genannten Proteine in HCC44 und H23-Zellen nach transienter und stabiler Transfektion mit pEGFP-Rac1 bzw. -Rac1b untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Injektionskanüle (0,45x0,25mm)	Braun, Melsungen
Kultivierungsplatten (6, 12, 24, Vertiefungen)	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Petrischalen 6 cm, 10cm	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Greiner Bio One, Frickenhausen
Reaktionsgefäß (0,5, 1,5, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäßgefäße, <i>Safelock tubes</i>	Eppendorf, Wessling-Berzdorf

2.1.2 Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Blottingkammer EBK-202	CBS Scientific, USA
Blottingkammer EBK-202	Thermo Scientific, Dreieich
Elektrophoresekammer	Hoefer Scientific Instruments, USA
ELISA Plate Reader ELx800	Bio Tek, Bad Friedrichshall
LI-COR Odyssey SA	LI-COR Bioscience GmbH, Bad Homburg
Hereaus Megafuge 8	Thermo Scientific, Dreieich
Labofuge 400	Hereaus Instruments, Dreieich

Mikroskope	Hersteller
Juli™ Smart fluorescent cell analyser	OMNI Life Science, Bremen
Olympus IX81	Olympus Inc., Japan
Primo Vert	Zeiss, Oberkochen

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamidlösung 30% (m/V)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
BCA Protein Reagent A	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Bisacrylamidlösung 2% (m/V)	Roth, Karlsruhe
DMEM (<i>high glucose</i> ; 4,5g/l), Gibco	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
DMEM pur, Gibco	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Isobutanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kupfer (II) Sulfat Reagent B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Opti-MEM, Gibco	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Lipofectamin 2000, Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
LTX, Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
LTX Plus Reagent, Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PEI, Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Saccharose	Roth, Karlsruhe
N, N, N, N, - Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.4 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop Elements 11	Adobe Systems Software Ireland Limited
analySIS	SIS-Olympus, Münster
Gen5 (Version 2.0)	BioTek, Bad Friedrichshall
Image Studio Lite 5.2	Li-COR Biosciences
Odyssey SA Application, Software (Version 1.1.7)	Li-COR Biosciences

2.1.5 Prokaryontische und eukaryontische Zellen

(1) Escherichia coli Stämme

Stamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> Top 10	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

(2) Eukaryontische Zellen

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
Colo 699	Lungenkarzinom Typ: Lymphknotenmetastase, epitheliale Morphologie, <i>Homo Sapiens</i>	American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)
H23	Lungenadenokarzinom, Typ: Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, epitheliale Morphologie <i>Homo Sapiens</i>	American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) CRL 5800
HCC44	Lungenadenokarzinom Typ: Kleinzelliges Lungenkarzinom epitheliale Morphologie <i>Homo sapiens</i>	American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) ACC- 534
HEK 293	Embryonale Nierenzellen, epitheliale Morphologie <i>Homo sapiens</i>	American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) CRL 1573
HCC44 EGFP	pEGFP C1	Arbeitsgruppe Prof. Menke, Laura Scharlibbe

(3) Plasmide

Tabelle 2: Zur transienten und stabilen Transfektion verwendete Plasmide

Plasmid	Herkunft
pEGFP N1	Clontech, Heidelberg
pEGFP C1	Clontech, Heidelberg
pEGFP C1/ Rac1	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Menke
pEGFP C1/ Rac1b	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Menke

2.1.6 Molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
Plasmid Midi Preparation	QIAGEN, Hilden

2.1.7 Standardisierte Puffer und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
Blockierungslösung	5 % Magermilchpulver (w/V) gelöst in TBS
Blockierungslösung für Immunfluoreszenz	3% Magermilchpulver (w/V) gelöst in TBS
Blottingpuffer	25 mM Tris HCl 0,1% SDS (w/V) 1,5% Glycin (w/V) 20% Methanol (v/V)
10x CMF- PBS Puffer pH 7,2	140 mM NaCl 2,7 mM KCL 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 KH ₂ PO ₄
Elektrophoreselaufpuffer	0,5 M Tris 1,5 M Glycin 1% SDS
LB-Medium pH 7,5	1% Bacto™ Trypton (m/V) 0,5% Hefeextrakt (m/V) 1% NaCl (m/V)
Ponceau-S-Lösung	0,2% Ponceau S (w/V) 3% Trichloressigsäure (v/V) in dH ₂ O

10x Probenpuffer	0,2 M Tris HCl 1 M Saccharose Spatelspitze Bromphenolblau Vor Gebrauch hinzufügen pro 250 µl Stammlösung 50µl SDS, 1 kleine Spatelspitze DTT
2x p38- Ripa	50 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1% Triton X-100 (v/V) Vor Gebrauch hinzufügen: Proteinaseinhibitoren und Phosphatase- inhibitoren
10x Phosphostopp	PhosphoStop (Roche, Mannheim), Cat. No: 04909845001
100x Proteinaseinhibitor	1,39 mM Pefablos 15 µM Aprotinin 21 µM Leupeptin 50 µM Trypsin- Inhibitor
1x Ripa- Puffer pH 7,2	50 mM Tris HCl 150 mM NaCl 1% Triton X-100 (v/V) 0,5% Na- Desoxycholat (w/V) 0,1% SDS (w/V) Vor Gebrauch hinzufügen: Proteinaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren
TCM-Puffer	10 mM Tris HCl 10 mM CaCl ₂ 10 mM MgCl ₂
10x TBS pH 7,4	20 mM Tris HCl 150 mM NaCl
10x TBST pH 7,4	10 mM Tris HCl 150 mM NaCl 1% Tween 20 (v/V)

2.1.8 Verwendete Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper für die Westernblotversuche. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 3% BSA-TBST.

Antikörper	reagiert mit	Verdünnung (Westernblot)	aus Spezies	Hersteller
Anti-GFP		1:1000	Maus	Roche, Cat No. 11814460001
AKT (pan)	Mensch, Maus, Ratte, Affe	1:2000	Maus	Cell Signaling, #2920
α -Catenin		1:4000	Kaninchen	Sigma Aldrich, C2081
β -Aktin	Maus, Ratte, Mensch	1:5000	Maus	Sigma-Aldrich, A5441
β -Catenin	Maus, Ratte, Mensch, Hund	1:5000	Kaninchen	Sigma-Aldrich, C2206
E-Cadherin	Maus, Ratte, Mensch, Hund	1:4000	Maus	Becton Dickinson, 612168
GAPDH	Rind, Huhn, Mensch, Maus, Ratte, Kaninchen, Schwein	1:1000- 1:5000	Kaninchen	Rockland, Code: 600-401-A33
JNK1	Maus, Mensch, Ratte	1:1000	Maus	BD Transd, #551196
p38	Mensch, Maus, Ratte	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #9212
p38		1:1000	Maus	BD Becton Dickinson, 612168
Phospho-p38	Mensch, Maus, Ratte	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #4511 S
p44/42 MAPK	Maus, Mensch, Ratte	1:2000	Maus	Cell Signaling, #4696
Phospho-p44/42 MAPK	Mensch, Maus, Ratte, Affe, Nerz, Schwein, S. cerevisiae, Hamster, Rind, Hund, C. elegans, D. melanogaster	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #4370
phospho-AKT	Mensch, Maus, Ratte, Hamster, Zebrafisch, Rind, Affe, D. melanogaster	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #4060
phospho-SAPK/JNK	Mensch, Maus, Ratte, Affe	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #4671S
Paxillin	Maus, Ratte, Huhn, Hund	1:1000	Maus	BD Biosciences, Cat.No: 610051
Vimentin	Maus, Mensch, Ratte, Affe	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #5741

Tabelle 4: Eingesetzte Sekundärantikörper. Alexa und Cy3 sind Fluorophore, die eine Visualisierung der Antikörper ermöglichen. Die Antikörper sind verdünnt in 3% BSA-TBST und werden mehrfach verwendet.

Antikörper gegen	Gekoppelt an	Verdünnung im Westernblot	aus Spezies	Hersteller
Maus IgG	Alexa 488	1:15000	Ziege	Mol.Probes A-11001
Maus IgG	Cy3	1:15000	Ziege	Sigma-Aldrich
Kaninchen IgG	Alexa 488	1:15000	Ziege	Mol. probes 1-11088
Kaninchen IgG	Cy3	1:2000	Ziege	Dianova 111-166-045

2.1.9 Standards

Protein-Standard:

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)

kDa: 170; 130; 95; 72; 55; 43; 35; 25; 17;10

2.2 Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die angewandten Methoden näher erläutert. Darunter fallen Zellkultivierung, Passagieren von Zellen, Zellzahlbestimmung und die Kryokonservierung der Zellen. Alle Methoden wurden nach der Standardanleitung der AG Menke ausgeführt.

2.2.1 Zellkultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, *high glucose* 4,5g) kultiviert. Diesem Medium wurden 10% hitzeinaktiviertes Fötale Kälberserum (FCS), 1% L- Glutamin und 1% nicht-essentieller Aminosäuremix hinzugefügt. Das Medium wurde durch einen *Filter* (0,2 µm) steril filtriert. Im Folgenden wird das Medium als DMEM-Komplettmedium bezeichnet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 10 cm Petrischalen im 10% CO₂- Inkubator bei 37° Celsius. Das Medium wurde im Abstand von 2-3 Tagen gewechselt. Dies war nötig, um die angefallenen Stoffwechselprodukte der Zellen zu entfernen und diesen neue Nährstoffe zukommen zu lassen. Die Zellarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkband durchgeführt.

2.2.2 Passagieren der Zellen

Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen subkultiviert oder Versuchen zugeführt. Zum Passagieren (Verdünnung der Zellen und Übersiedlung in neue Zellschalen) wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und die Zellen wurden 3x gründlich mit CMF-PBS (steril) gewaschen. Die Ablösung der Zellen von der Petrischale erfolgte durch Inkubation mit 3 ml Trypsin-EDTA Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA) für 3-5 Minuten im CO₂-Inkubator bei 37 °C. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde dieses mit 5 ml Kulturmedium versetzt. Diese Suspension wurde in ein steriles 15 ml Falcon überführt und bei 1000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment wurde je nach Größe in 3 ml, 5 ml oder 10 ml Kulturmedium resuspendiert und homogenisiert. Die Aussaat von HCC44-Zellen in neue 10 cm Kulturschalen erfolgte im Verhältnis 1:10 oder 1:20, von den H23-Zellen 1: 5 oder 1:10 und von den Colo699-Zellen 1:10.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämatocytometer (Neubauer-Zählkammer)

Auf die Neubauer-Zählkammer wurde unter Anfeuchtung der Auflageflächen ein geschliffenes Deckglas aufgelegt. Zur genauen Bestimmung der Zellzahl in der Suspension wurde mittels Pasteurpipette Zellsuspension zwischen Deckglas und Neubauer-Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden die Zellen in mindestens 2 Quadraten ausgezählt. Aus der ermittelten Anzahl wurde der Mittelwert gebildet und mit 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl für 1ml zu erhalten.

2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -170 °C überführt. Vorbereitend wurden die Zellen wie bei der Subkultivierung mittels Trypsin-EDTA von den Schalen abgelöst und in Kulturmedium aufgenommen. 1ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen pipettiert und mit 1ml 10% DMSO (v/V) in Kompletmedium bedeckt, damit sich keine Eiskristalle bilden. Die Kryoröhrchen wurden mehrmals invertiert und für 24 Stunden bei -80 °C gleichmäßig runtergekühlt. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in Gefrierboxen in flüssigen Stickstoff überführt. Auf diese Weise sind die Zellen mehrere Jahre konservierbar.

2.3 Proteinbiochemische Verfahren

2.3.1 Proteinlysatherstellung

Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen vor der Proteinextraktion mit TGF β 1 (Endkonzentration $c=10\text{ng/ml}$) für eine Dauer von 120 Minuten stimuliert. Um die Proteine der Zellen zu untersuchen, mussten die Zellen aufgeschlossen werden. Dazu wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt, die Zellkulturen mit kaltem CMF-PBS gewaschen und mit kühlem Lysispuffer (je nach Versuch RIPA-, p38 RIPA-Puffer) auf Eis inkubiert.

Für die 6 cm Schalen wurden 150 μl Lysispuffer und für die 10 cm Schalen 350 μl Lysispuffer verwendet. Bei der Zerstörung der Zellmembranen werden auch Proteasen frei. Um diese zu inhibieren, wurde dem Lysispuffer Proteinaseinhibitor zugeführt. Gegen die Dephosphorylierung der Proteine wurde Phosphatase-Inhibitor (Phospho-Stopp) beigemischt. Der Lysispuffer wurde gleichmäßig auf den Zellrasen verteilt. Nachdem sich die Zellen leicht von der Zellschale gelöst haben, wurden diese mit einem Zellschaber sorgfältig abgekratzt und die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde durch 6-maliges Aufziehen mit einer Einmal-Injektions-Kanüle homogenisiert. Das Zelllysate wurde anschließend 10 Minuten bei 4°C bei 12000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildete sich ein klarer Überstand, der abgenommen und portioniert in *Safelock tubes* bei -170 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde und so anschließend bei -80°C für längere Zeit verwahrbar war. Falls jedoch die Phosphorylierungsmuster der Zellen untersucht werden sollten, wurden die Zelllysate innerhalb weniger Stunden weiterverarbeitet, da Phosphorylierungen instabile Zustände darstellen und sich nach längerer Zeit nicht mehr darstellen lassen.

2.3.2 Photometrische Proteinbestimmung

Nach der Lysatherstellung wurden die Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurde die Proteinkonzentration benötigt. Diese wurde anhand des *Bicinchoninic Acid Protein Assay* nach einem Test-Kit der Firma Sigma-Aldrich, Nr. BCA-1 bestimmt. Das Prinzip beruht auf der proteinabhängigen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu. Es bildet sich ein farbiger Komplex, der bei $\lambda=562\text{nm}$ mit einem *ELISA-Reader* detektiert wird. In einem 96er-Well wurde zuerst eine Eichgerade (Tabelle 5) pipettiert. Dazu wurde eine 2 mg/ml enthaltende BSA (bovines Serumalbumin) Lösung hergestellt.

Die Proteine wurden in einem Verhältnis von 1:10 aufbereitet: Zu 5 µl Proteinlösung wurden 45 µl destilliertes Wasser (dH₂O) hinzugefügt. Zur Messung der Doppelwerte wurden je 20 µl dieser Lösung in die Wells pipettiert. Jedes Well wurde mit 180 µl Farbreagenz (50 Teile Bicinchoninic Acid Lösung und 1 Teil Kupfer-(II)-sulfat-Lösung) aufgefüllt. Durch leichtes Schwenken wurden die Lösungen vermischt und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und bei 562 nm gegen Wasser, die 0 µg Protein enthaltende Probe dient als Kontroll-Wert, im *ELISA-Reader* gemessen. Anhand der Extinktionswerte wurde mit einem Excel-Programm durch eine Regressionsanalyse die Proteinkonzentration untersucht.

Tabelle 5: Eichgerade zur Proteinbestimmung

	1	2	3	4	5	6	7
A	20µl H ₂ O	2µl BSA+ 18µl H ₂ O	4µl BSA+ 16µl H ₂ O	6µl BSA+ 14µl H ₂ O	8µl BSA+ 12µl H ₂ O	10µl BSA+ 10µl H ₂ O	12,5µl BSA+ 7,5µl H ₂ O
B	20µl H ₂ O	2µl BSA+ 18µl H ₂ O	4µl BSA+ 16µl H ₂ O	6µl BSA+ 14µl H ₂ O	16µl BSA+ 12µl H ₂ O	10µl BSA+ 10µl H ₂ O	12,5µl BSA+ 7,5µl H ₂ O

2.3.3 SDS- Gelelektrophorese

Mit der SDS-Gelelektrophorese können Proteine unabhängig von ihrer Ladung der Größe nach aufgetrennt werden. Das anionische Detergens SDS (*sodium dodecyl sulfat*) überdeckt die Eigenladung der Proteine, sodass alle eine gleichmäßige, negative Ladung besitzen.

Die Proteine wandern in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, wobei kleine Proteine schneller wandern als große. Als Gelmatrix dient Polyacrylamid. Für alle SDS-*Pages* wurden in dieser Arbeit 10%-ige Trenngele benutzt. Um diese Gele zu gießen, wurden zwei Glasplatten mit Ethanol gereinigt, zwei *Spacer* (1 mm) an die vertikalen Seiten der Glasplatten gelegt, sodass die Glasplatten nicht unmittelbar aufeinander zu liegen kamen. Ein Dichtungsgummi um die Platten verhinderte das Auslaufen der Polyacrylamidlösung. Die Konstruktion wurde mit zwei Fixierungsklammern an der linken und rechten Seite stabilisiert. Die Chemikalien (Tabelle 6) wurden schnell nacheinander in ein Becherglas pipettiert und mittels eines Magnetrührers und Rührfisches gemischt. Damit das Gel polymerisierte, wurden ein Polymerisationskatalysator, Tetramethylethyldiamid (TEMED) und ein Radikalstarter, Ammoniumperoxidsulfat (APS), benötigt und zuletzt zu

der Lösung hinzugegeben. Das Gel wurde blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Auf das gegossene Gel wurde mit Wasser gesättigtes Isobutanol gegeben. Dieses wurde nach 30 Minuten abgegossen und das Gel mit dH₂O gereinigt. Zur vollständigen Auspolymerisation des Gels benötigte es bei 4°C 10 Stunden. Anschließend wurde das Sammelgel (Tabelle 6) gegossen. Die Chemikalien wurden nacheinander in ein Becherglas pipettiert und gemischt. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegeben und in das Sammelgel wurde ein 10-er Probenkamm eingesetzt. Zur vollständigen Auspolymerisation des Sammelgels dauerte es 30 Minuten. Danach wurde der Probenkamm langsam aus dem Sammelgel gezogen, die Gele in eine Gelelektrophoresekammer gespannt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt und die Proteintaschen der Sammelgele wurden mit dem SDS-Laufpuffer von kleinen Luftblasen gereinigt.

Je nach Versuch wurden 30 µg oder 50 µg Protein mit 1/5 Probenpuffer gemischt. Die Proben wurden zentrifugiert, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend wieder zentrifugiert, damit das Kondenswasser der Probe zugeführt werden konnte. In die erste Probenkammer wurden 5 µl eines standardisierten Größenmarkers (Fermentas™) pipettiert, der zuvor mit 0,002% Bromphenolblau versetzt wurde. Die weiteren Westernblotsuren wurden mit insgesamt 30 µl Probengemisch befüllt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch Anlage von Strom an das Gel. Für 15 Minuten wurde mit 70 V fokussiert, sodass die Proben das Sammelgel durchliefen und danach wurden für 1,5 Stunden 110 V bei 50 mA angelegt.

Tabelle 6: Maßangaben für zwei Trenn- und Sammelgele

Chemikalie	10% Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid	2,6 ml	0,38 ml
2% Bisacrylamid	1 ml	0,15 ml
3M Tris pH 8,8	1 ml	-
1M Tris pH 6,8	-	0,38 ml
10% SDS	0,08 ml	0,03 ml
60% Saccharose	-	0,75 ml
dH ₂ O	3,2 ml	1,3 ml
TEMED	8 µl	4 µl
10% APS	35 µl	35 µl

2.3.4 Proteintransfer mittels Westernblot

Nach dem Gellauf erfolgte der Proteintransfer auf eine Membran in einem Tankblot. Dazu wurden der Reihe nach folgende Materialien luftblasenfrei auf ein Kunststoffgitter aufgebracht: Filzschwämme, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Acrylamidgel, Filterpapier und Filzschwämme. Alle Materialien wurden zuvor 15 Minuten in

Transferpuffer gelegt. Das Kunststoffgitter wurde zusammengeklappt in den Tankblot gesetzt. Die Seite mit der Nitrocellulose musste zu der Anode zeigen, damit die Proteine nach Anlegen des Stroms von der Kathode zur Anode wandern konnten und so auf die Nitrocellulose transferiert wurden.

Die Transferkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und mit einem Rührfisch auf einem Magnetrührer gestellt. Die Blottingdauer bei 4°C variierte je nach angelegter konstanter Stromspannung: bei 50 Volt waren es 1,5 Stunden und bei 20 Volt wurden 10 Stunden benötigt. Um den Übertragungserfolg der Proteine zu dokumentieren wurde die Nitrocellulose mit Ponceau-Rot-Lösung gefärbt, mit Wasser gespült und eingescannt. Die Proteinbanden wurden als rote Banden sichtbar, die Markerbanden waren in blau sichtbar und wurden mit einem Bleistift nachgezogen. Die Nitrocellulosemembran wurde mit TBS gespült und vollständig mit TBS oder CMF-PBS entfärbt. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran mit 5% Magermilchpulver (1,25g in 25ml TBST gelöst) zur unspezifischen Bindung von Proteinen für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit TBS und einmal mit CMF-PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen.

2.3.5 Proteinnachweis mittels Immunfluoreszenz

Mit Hilfe von Antikörpern können spezifische Proteine auf der Nitrocellulosemembran sichtbar gemacht werden. Die Antikörper wurden in 3% BSA in TBST verdünnt. Die Membran wurde mit dem proteinspezifischen Primärantikörper über Nacht inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper abgegossen und die Membran für jeweils 5 Minuten 2x mit TBS und 1x mit TBST gewaschen. Dann wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in 3% BSA in TBST für 1- 1,5 Stunden inkubiert. Diese Lösung wurde ebenfalls abgegossen und die Membran 2x mit TBS und 1x mit TBST gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels *Li-COR Odyssey SA* und der Software *Odyssey SA*. Die Sekundärantikörper waren fluoreszenzgekoppelt, sodass diese durch Anregung bei $\lambda = 685\text{nm}$ und $\lambda = 758\text{nm}$ im *Li-COR Odyssey SA* als rote (685nm) und grüne (758nm) Banden sichtbar wurden.

2.3.6 Densitometrische Auswertung

Unterstützend zu der semiquantitativen Bewertung der Western Blots wurden die detektierten Banden mit Hilfe der densitometrischen Analyse ausgewertet. Mittels der densitometrischen Messung wurde die Intensität des Signals gemessen. Es wurde der Grauwert pro Pixel bestimmt. Jede Bande wurde einzeln ausgemessen und ergab einen

Wert. Um anschließend die Phosphorylierung beurteilen zu können, wurden die primären Bandenintensitäten der phosphorylierten Proteine und der unphosphorylierten Proteine zueinander ins Verhältnis gesetzt $\left(\frac{\text{phosphoryliertes Protein}}{\text{nicht-phosphoryliertes Protein}}\right) * 100$. Die EGFP-Kontrolle wurde dem numerischen Wert 1 gleichgesetzt und die normalisierten Werten wurde

n mit der EGFP-Kontrolle verglichen, sodass auf diese Weise Werte für den Phosphorylierungsgrad der einzelnen Proteine bestimmt werden konnte. Abweichungen zwischen der optischen Auswertung und der densitometrischen ergaben sich aus Messungenauigkeiten hinsichtlich der Größe der ausgemessenen Fläche, Unregelmäßigkeiten in der Beladung und Größe der Banden.

2.4 Transfektion

Es werden die transiente und stabile Transfektion unterschieden. Bei der transienten Transfektion wird mittels eines Plasmids eine cDNA in die Zelle eingebracht. Die DNA integriert in diesem Fall nicht in das Genom, sondern wird für kurze Zeit stark exprimiert. Die stabile Transfektion beruht darauf, dass das Plasmid in das Genom der Zelle integriert wird und die cDNA dauerhaft exprimiert wird. Die in dieser Arbeit benutzte Methode die Plasmide in die Zelle zu überführen, wird Lipofektion genannt. Kationische Lipide (Lipofectamin 2000, Lipofectamin LTX und LTX Plus Reagent) vereinfachen die Aufnahme der DNA über die Zellmembran in die Zelle. Die Lipide bestehen aus einer positiv geladenen Kopfgruppe und 1 bis 2 Kohlenwasserstoffschwänzen.

Die positiv geladene Kopfgruppe reguliert die Interaktion zwischen dem Lipid und dem Phosphatgerüst der DNA. Auf diese Weise wird die Kondensation der DNA erleichtert. Die Lipide sind oft mit neutral geladenen Co-Lipiden oder Helfer- Lipiden modifiziert, sodass uni lamellare Liposome mit einer positiv geladenen Oberfläche entstehen. Diese regulieren die Interaktion zwischen der DNA und der negativ geladenen Zellmembran. Der Lipid-DNA-Komplex wird über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Es wird angenommen, dass sich kleine Granula bilden, die nacheinander aufgenommen werden. Demnach ist es von Vorteil, wenn die Inkubation mit dem Transfektionsreagenz über mehrere Stunden erfolgt.

2.4.1 Transiente Transfektion

Die Zellen (HCC44, H23) wurden in 6er Wells ausgesät. Für die Transfektion mussten diese eine 90%-ige Konfluenz aufweisen. Für die HCC44 Zellen wurde das

Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 gewählt und für die H23 Zellen Lipofectamin LTX und LTX Plus Reagenz. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 5 aufgeführt. Für beide Reagenzien wurden 2 Lösungen wie folgt angesetzt:

Lipofectamin 2000

Lösung 1: 100 µl Opti MEM + 2 µg DNA, vortexen

Lösung 2: 100 µl Opti MEM + 7 µl Lipofectamin 2000, vortexen

Lipofectamin LTX

Lösung 1: 100 µl Opti MEM + 2 µg DNA + 2,5 µl LTX Plus Reagent, vortexen

Lösung 2: 100 µl Opti MEM + 7 µl Lipofectamin LTX, vortexen

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

Plasmid	Konzentration
pEGFP C1	1 µg/µl
pEGFP C1/Rac1	0,25 µg/µl
pEGFP C1/ Rac1b	0,45 µg/µl

Die Lösungen mussten bei Raumtemperatur inkubieren. Danach wurde Lösung 1 zu Lösung 2 gegeben und in einem Vortexmischer vermischt. Die Lösung wurde wiederum 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium von den zu transfizierenden Zellen abgesaugt und je Well wurden 1,5 µl DMEM-Komplettmedium vorgelegt. Der Transfektionsansatz wurde tröpfchenweise gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit dem Transfektionsmedium bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach 6 Stunden erfolgte der Medienwechsel mit DMEM-Komplettmedium. Die Zellen inkubierten über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder direkt Versuchen zugeführt oder vorher für zwei Stunden mit TGFβ inkubiert (siehe 2.4.3).

2.4.2 Stabile Transfektion

Wie eingangs beschrieben, integriert bei der stabilen Transfektion die eingebrachte DNA dauerhaft in das Genom. Die Zellen werden im Gegensatz zur transienten Transfektion kloniert und selektioniert. Die stabile Transfektion wurde in dieser Arbeit mit HCC44-Zellen durchgeführt. Die ersten drei Tage gleichen dem Transfektionsschema der transienten Transfektion (siehe 2.2.3.1). Ab Tag 4 wurden die Zellen im Selektionsmedium kultiviert: DMEM-Komplettmedium + 1,4 ml Geneticin (G-418, c=363,6 mg/ml (Stammlösung)).

An Tag 5 wurden die Zellen subkultiviert. Pro 6er Well wurden die Zellen auf je drei 10 cm Schalen passagiert. Bis Tag 14 wurden die Zellen wachsen gelassen. Es sollten sich runde, abgrenzbare Zellklone bilden. Die Zellklone erschienen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün und wuchsen kugelig übereinander. An Tag 15 erfolgte das „Zellpicken“. Dazu wurden die Zellen unter dem auf 37°C vorgewärmten Olympus Mikroskop mit einer 10 µl Pipette vorsichtig zusammengeschoben und dann mit der Pipette aufgesogen. Sofort wurden die Zellen in ein mit DMEM-Komplettmedium + G-418 befülltes 24er Well überführt. Damit sich die Zellen voneinander lösen, wurden diese mittels der Pipette mehrmals auf- und abgesogen. Bis Tag 17 regenerierten sich die Zellen, sodass diese erst ab Tag 17 weiter passagiert werden konnten. Dazu wurden die Zellen mit je 100 µl Trypsin von der Zellschale abgelöst und drei Minuten im CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert. Es wurde 1ml DMEM-Komplettmedium zum Neutralisieren des Trypsins hinzugegeben. Je 500 µl der Zellen wurden unter Hinzugabe von DMEM-Komplettmedium und G-418-Selektionsmedium in 12er Wells überführt.

Die Zellen sollten in den größeren Wells flächig wachsen und wurden bei Ausbildung eines konfluenten Zellrasens auf 6 cm Schalen verteilt. Erreichten die Zellen in den 6 cm Schalen eine 100%-ige Konfluenz wurden diese mittels Hinzugabe von Trypsin wie oben beschrieben von der Zellschale abgelöst. 1 ml der Zelllösung wurde kryokonserviert und 1ml wurde zu je 500 µl auf zwei 6 cm Schalen verteilt. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Es wurden nur die Zellklone weitergeführt, die 95% grün-fluoreszierende Zellen aufwiesen. Am Ende dieses Vorgangs wurden von den EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-Klonen je 2 Klone als stabile Zellen etabliert: EGFP-Rac1 C4, EGFP-Rac1 D6.2, EGFP-Rac1b D5 und EGFP-Rac1b D2.1. Die Bezeichnungen leiten sich von den Nummerierungen der Aufzucht Wells ab.

2.4.3 Stimulation mit TGFβ

Je nach Versuchsaufbau und Fragestellung wurden die Zellen, bevor ein Zelllysate hergestellt worden ist, zwei Stunden mit TGFβ stimuliert. Die Konzentration von TGFβ beträgt c= 10 ng/ml. Diese wurden dann für weitere 2 Stunden bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend erfolgte die Erstellung der Proteinlysate.

2.2.4 Mikrobiologische Methoden

Unter die mikrobiologischen Methoden fallen neben der Herstellung von (1) Luria-Bertani-Agarplatten, die (2) Transformation kompetenter Bakterien und die (3) Isolation von Plasmid-DNA.

(1) Zur Anzucht von *Escherichia coli* Top 10 Bakterien wurden Luria-Bertani (LB)-Agarplatten (1,5% m/V) benötigt. Das LB-Medium wurde zuvor hergestellt und frisch autoklaviert geliefert. Unter ständigem Rühren mittels Rührfisch und Magnetrührer wurde es auf Handtemperatur gekühlt und mit Kanamycin (Antibiotikum) versetzt. In jede sterile 10 cm Petrischale wurden 20 ml Agar-Medium gegossen. Diese wurden nach Erstarren bei 4 °C gelagert.

(2) Die kompetenten *Escherichia coli* Top 10 Bakterien werden bei -80 °C gelagert. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Es wurden 1-2 µl (0,05-1 µg) des zu transformierenden Plasmids in Reaktionsgefäße vorgelegt. In dieser Arbeit wurden pEGFP- Rac1 und pEGFP-Rac1b retransformiert. In die Reaktionsgefäße wurden 100 µl der kompetenten Zellen und 100 µl TCM- Puffer gegeben. Die Suspension wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, damit die Bakterien die Plasmide aufnehmen konnten. Anschließend wurde der Zellansatz für 1 Minute einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und im Anschluss 1 Minute auf Eis inkubiert. Es wurden 700 µl Raumtemperatur warmes LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien wurden anschließend für 45 Minuten bei 37 °C bei 600-700 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 150-200 µl der Bakterien mit einem sterilen Spatel auf den LB-Agarplatten ausgestrichen. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden in je 1 Aufzuchttröhrchen 5 ml LB-Medium, 10 µl Kanamycin und 1 abgeschabter Bakterienklon gegeben. Die Röhrchen wurden über Nacht bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Hinterher wurden 1ml Bakterien mit 150ml LB-Medium und 300ul Kanamycin in einem Erlenmeyerkolben gegeben. Dieser Ansatz inkubierte bei 37 °C und 600 rpm über Nacht.

(3) Mit dem *Midi-Prep-Kits* von Qiagen konnten nach Anleitung bis zu 100 µg Plasmid-DNA aus ungefähr 100 ml Bakterien eluiert werden. Im letzten Schritt wurde die gewonnene DNA in HCL Puffer, pH 8,5 gelöst. Die gewonnene DNA wurde durch Ethanolfällung aufgereinigt. Mittels des Spektralphotometers NanoDrop konnte die Konzentration der DNA-Probe photometrisch bestimmt werden. Das Spektralphotometer maß über das gesamte Spektrum von 190 nm bis 840 nm die Remissionswerte der Probe. Zuerst wurde der Puffer (Tris-HCl-Puffer), in dem die Probe gelöst war, als

Kalibrierungswert gemessen. Es wurde der Reflexionsgrad der Probe in Bezug auf den Kalibrierungswert gemessen und aus diesen Werten wurde eine Remissionskurve gebildet. Mit dem vorgewählten Programm *Nucleid Acid* in der NanoDrop Analysesoftware konnte die Konzentration der Probe ermittelt werden.

$$c = \frac{(A * \varepsilon)}{b}$$

c= Konzentration in mol/Liter

A= Absorption in Absorbtionseinheiten (U)

ε = Absorptionskoeffizient Liter/mol-cm

b= Weglänge

3 Ergebnisse

3.1 Transfektionsversuche mit EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b in HCC44 und H23-Zellen

Die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden mit humanen Lungenadenokarzinomzellen durchgeführt. Es wurden die Zelllinien H23 und HCC44 verwendet. Beide Zelllinien entstammen Lungenadenokarzinomen. Zwischen den Zelllinien treten phänotypische Unterschiede auf: Die H23-Zellen weisen einen epithelialen Phänotyp auf, der jedoch nicht einheitlich ist. Sie bilden überwiegend eine oberflächenbedeckende Zellschicht mit engen Zellkontakten und können dabei in spindelförmiger oder auch polygonaler Form auftreten. Die HCC44-Zellen haben einen mesenchymalen Phänotyp und charakterisieren sich phänotypisch durch ihre spindelförmige und Fibroblasten-ähnliche Form. Ein weiterer Unterschied zwischen den Zelllinien ist die höhere Teilungsrate der HCC44-Zellen.

Mittels transienter Transfektion sollte im ersten Schritt Fremd-DNA in die Zellen eingeführt werden, um so eine vorübergehende Expression der Proteine EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b zu erzielen. Die Proteine Rac1 und Rac1b wurden mit dem grün-fluoreszierenden Protein EGFP als Fusionsprotein exprimiert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die mit pEGFP-Plasmiden transfiziert wurden. Zunächst wurden mehrere Zelllinien, darunter Colo 699, H23, HCC44 auf ihre Transfizierbarkeit untersucht. Die Versuche wurden anhand der erzielten Transfektionseffizienz, die als Quotient aus transfizierten zu nicht-transfizierten Zellen definiert wurde, ausgewertet (siehe Kapitel 2). Für die Colo 699-Zellen lag die durchschnittliche Transfektionseffizienz bei 40%. Für die H23-Zellen ließen sich durchschnittliche Transfektionseffizienzen von 60% erzielen und für die HCC44-Zellen von durchschnittlich 70%. Aus diesem Grund wurden die Zelllinien H23 und HCC44 für die weiteren Versuche ausgewählt, da sie die höchsten Transfektionseffizienzen aufwiesen.

Um ein Transfektionsreagenz mit einer möglichst hohen Transfektionseffizienz zu nutzen, wurden im Vorfeld in Transfektionsversuchen mit H23- und HCC44-Zellen die Transfektionsreagenzien PEI, Lipofectamin 2000 und Lipofectamin LTX hinsichtlich der Transfektionseffizienz untersucht. Dazu wurden die Konzentration des zu transfizierenden Plasmids (pEGFP, pEGFP-Rac1, pEGFP-Rac1b) und die Mengen des

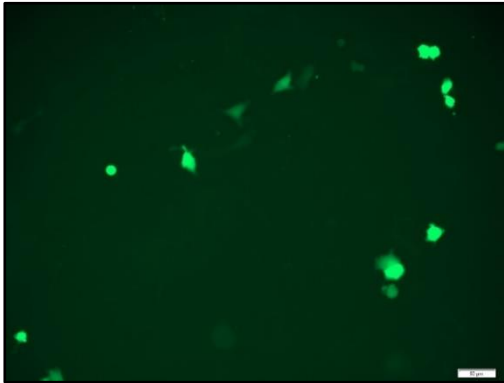
Transfektionsreagenz variiert. Als effizientestes Transfektionsreagenz zeigte sich für die Zelllinie H23 Lipofectamin LTX und für die Zelllinie HCC44 Lipofectamin 2000.

In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse der Transfektionen mit Hilfe der Immunfluoreszenz gezeigt. Zum Vergleich ist ein Phasenkontrastbild dargestellt, sodass zu erkennen ist, in welchen und in wie vielen Zellen das Fusionsprotein erfolgreich exprimiert wurde. Die Abbildungen 4a-c zeigen transfizierte H23-Zellen. Bei den mit pEGFP transfizierten Zellen konnte festgestellt werden, dass nur wenige Zellen das Plasmid aufnahmen. Viele Zellen erschienen abgekugelt. Man konnte keine neu gebildeten Zellausläufer oder Zell-Zellkontakte erkennen (Abb. 4a). Kugeln sich die Zellen ab, kann das ein Hinweis darauf sein, dass die Transfektion für diese Zellen toxisch war und diese die Apoptose induzierten.

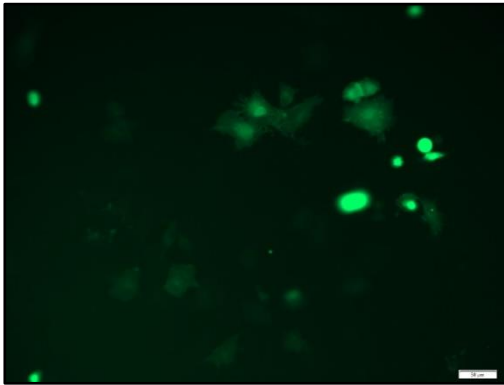
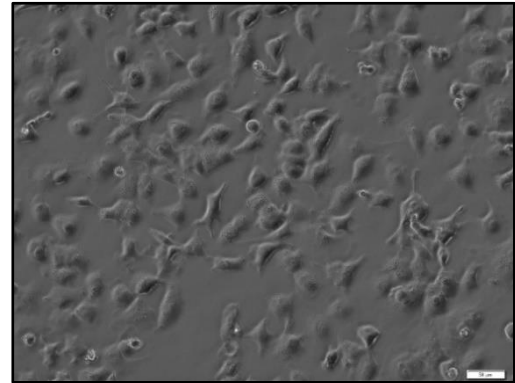
Die mit pEGFP-Rac1 transfizierten Zellen bildeten mehr Zellausläufer als die Kontrollzellen aus (Abb.4b, blaue Pfeile) und haben eine abgeflachtere, eher länglichere Form angenommen. In den EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen konnte man gut die Lokalisation der transfizierten Proteine nachvollziehen. Hier war das Fluoreszenzsignal am stärksten im Zellkern und an der Zellmembran. Das Zytoplasma war in den abgeflachten Zellen kaum angefärbt, sodass daraus geschlossen wurde, dass sowohl EGFP-Rac1 als auch EGFP-Rac1b vor allem im Zellkern, in der Zellmembran und in den Zellausläufern vorhanden war (Abb. 4b und 4c). Man konnte darüber hinaus erkennen, dass die Zellen spitz zulaufende Zellausläufer ausgebildet hatten. Die Zellform war vornehmlich spindelförmig flächig (Abb.4c). Mittels der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung konnte nicht abgegrenzt werden, ob es sich um Lamellipodien, die vor allem an der *Leading-edge* der Zelle gebildet werden oder um Filopodien handelt.

Die Abbildungen 4d-f stellen die Transfektionen von pEGFP, pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b in HCC44-Zellen dar. Die mit pEGFP transfizierten HCC44-Zellen (Abb. 4d) waren wie die H23-Zellen vornehmlich abgerundet, nur wenige wirkten flächig haftend. Von den EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen waren viele abgerundet. Einige Zellen fielen jedoch mit vielen verzweigten Zellausstülpungen auf (Abb.4e) Im Vergleich zu der EGFP-Kontrolle waren die mit pEGFP-Rac1 transfizierten Zellen flächiger und hatten mehr Zellausläufer (Abb.4e, weißer Pfeil). Das Protein EGFP-Rac1 schien vornehmlich im Zellkern und vereinzelt in der Zellmembran lokalisiert zu sein (Abb.4e, gelbe Pfeile). Abbildung 4f zeigt die Transfektion der HCC44-Zellen mit pEGFP-Rac1b. Die Zellen wirkten flächig mit vielen Zellausläufern. Das grün-fluoreszierende Signal war in den Zellausläufern (Abb.4f, violette Pfeile), in den Zell-Zellkontakten (rote Pfeile) und

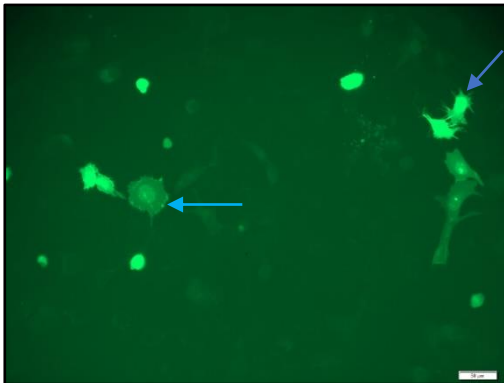
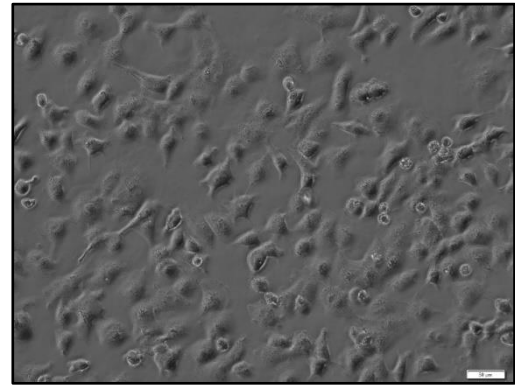
im Zellkern am intensivsten. Das Zytoplasma war im Vergleich zu den EGFP-exprimierenden Zellen nur wenig fluoreszierend.



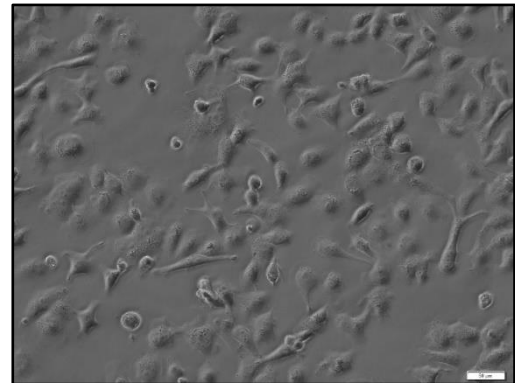
a: H23 pEGFP

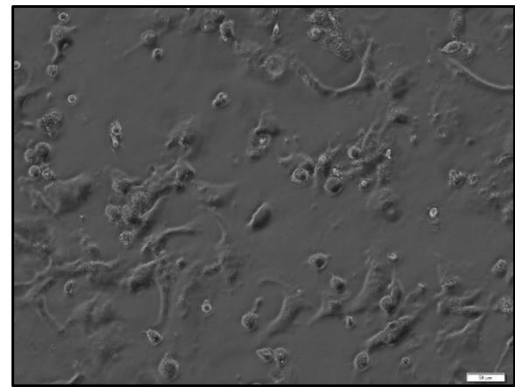
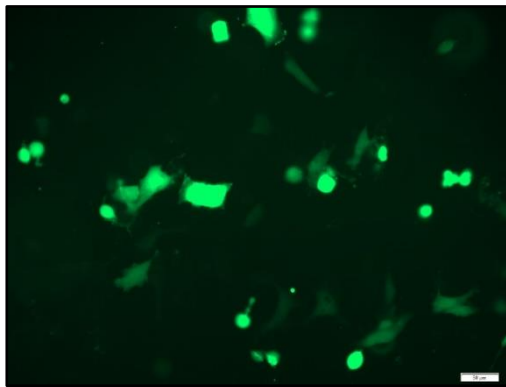


b: H23 pEGFP-Rac1

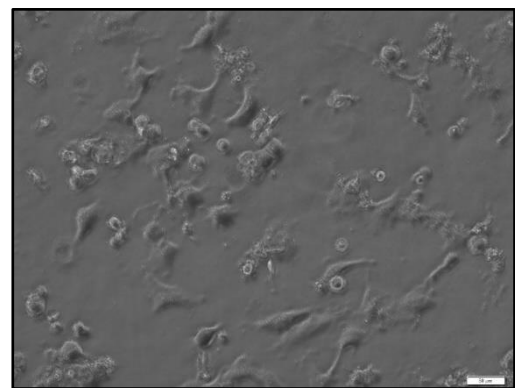
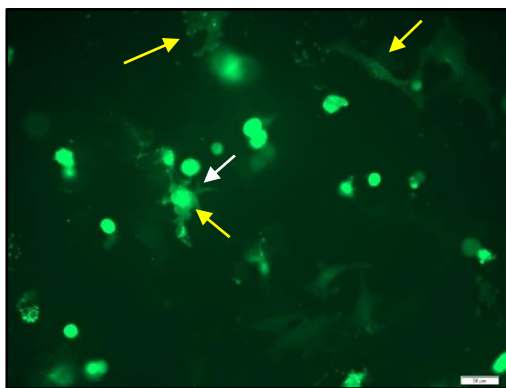


c: H23 pEGFP-Rac1b

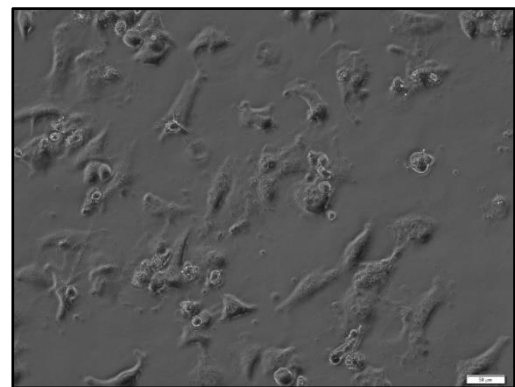
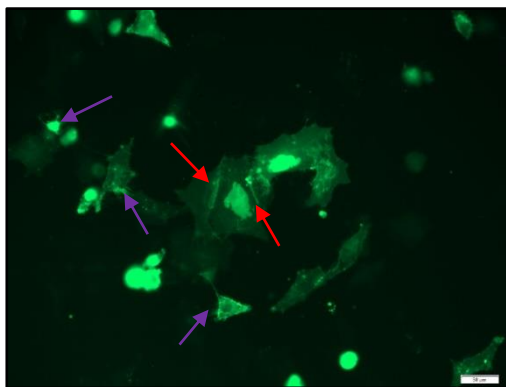




d: HCC44 pEGFP



e: HCC44 pEGFP-Rac1



f: HCC44 pEGFP-Rac1b

Abbildung 4a-f: Transfektionsversuch mit den Zelllinien H23 und HCC44

Die Abbildung 4a-c zeigt H23-Zellen, nach der Transfektion mit pEGFP (Abb.4a), mit pEGFP-Rac1 (Abb.4b) und mit pEGFP-Rac1b (Abb.4c). Die Abbildungen 4d-f zeigen HCC44-Zellen nach der Transfektion mit pEGFP (Abb. 4d), mit pEGFP-Rac1 (Abb.4e) und mit pEGFP-Rac1b (Abb.4f). Betrachtet wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop und im Phasenkontrast. Die Pfeile markieren die im Text beschriebenen morphologischen Unterschiede durch die Überexpression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b im Vergleich zur Kontrolle EGFP. Der weiße Balken entspricht 50µm.

Im nächsten Schritt wurde mittels Westernblotanalyse untersucht, ob die Transfektion erfolgreich war und ob die Zellen die auf den Plasmiden codierten Proteine exprimierten. Die Analyse erfolgte über die Anfärbung mittels eines gegen EGFP-gerichteten Primärantikörpers. Als Beladungskontrolle diente das Haushaltsprotein GAPDH. In allen Zellproben, sowohl den H23-Zellen als auch HCC44-Zellen, konnten die transfizierten Proteine als Fusionsproteine nachgewiesen werden (Abb.5).

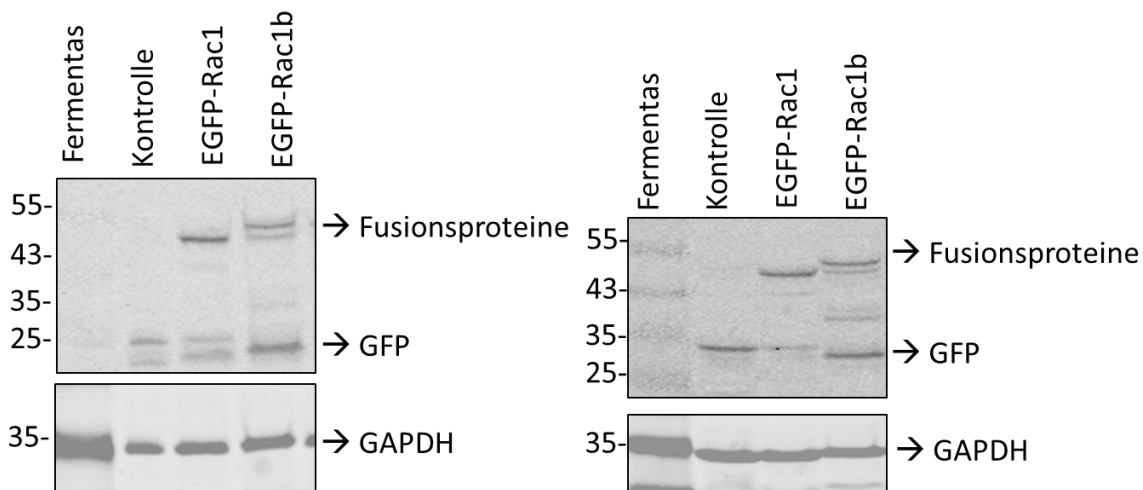


Abbildung 5 : Immunblot zum Nachweis der Expression von EGFP, EGFP-Rac1/-Rac1b in H23- und HCC44-Zellen.

Westernblot der H23-Zellen links und Westernblot der HCC44-Zellen ist rechts dargestellt. Die Transfektion erfolgte jeweils mit 2 µg pEGFP, pEGFP- Rac-/Rac1b. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis des Haushaltsproteins GAPDH. Die Beladung war in beiden Versuchen regelmäßig. Die mit GFP gekoppelten Proteine werden als Banden in beiden Abbildungen sichtbar. EGFP hat ein Molekulargewicht von 26,9 kDa, Rac1 ein Molekulargewicht von 21 kDa und Rac1b ein Molekulargewicht von 22kDa. In der Abbildung sieht man EGFP in der Kontrolle bei 26,9kDa und EGFP-Rac1 bei 47,9kDa und EGFP-Rac1b bei 48,9kDa. Die weiteren Banden stellen Abbaubanden dar.

3.2 Effekte von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf MAP-Kinasen und AKT in HCC44-Zellen

Nach der transienten Transfektion der HCC44 mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b wurde untersucht, ob diese zu einer Änderung der Phosphorylierung der Proteine ERK, p38, JNK des MAP-Kinase Signalweges und der Proteinkinase AKT führt. In den Kapiteln 3.2.1 bis einschließlich Kapitel 3.5.3 beziehen sich die Untersuchungen auf eine transiente Expression und anschließend in Kapitel 3.6 bis einschließlich 3.6.2 auf eine dauerhafte, stabile Expression von EGFP-Rac1/1b.

Eine verstärkte Phosphorylierung wird als Zeichen für eine Aktivierung der Proteinkinasen angesehen. Die H23- und HCC44-Zellen wurde mit pEGFP-Rac1, pEGFP-Rac1b und pEGFP als Kontrolle transient transfiziert. Einige Zellen wurden am

darauffolgenden Tag für zwei Stunden mit 10ng/ml TGF β 1 stimuliert. Neben dem Einfluss von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die MAP-Kinasen und die Proteinkinase AKT, sollte in den Versuchen außerdem ein Augenmerk darauf geworfen werden, welchen Einfluss TGF β auf die Rac-abhängige Signaltransduktion hat.

Mittels phospho-spezifischer Antikörper wurde die Phosphorylierung der Proteine sichtbar gemacht. Anhand der Gesamtproteinmenge von ERK, p38, JNK und AKT konnte die gleichmäßige Beladung beurteilt werden. Mittels densitometrischer Messung der Westernblotbanden wurde die Intensität der Signale verglichen. Als eine Zunahme der Phosphorylierung in der densitometrischen Auswertung wurden Werte ab einer 1,5-fachen Erhöhung gewertet. Alle Werte zwischen 1,25 und 1,49 galten als eine tendenzielle Zunahme der Phosphorylierung. Eine geringere Aktivität der Kinasen wurde ab einem Wert von 0,5 definiert. Alle Werte zwischen 0,75 und 0,51 gaben Hinweis auf eine mögliche Abnahme der Aktivität.

3.2.1 Effekt von Rac1 und Rac1b auf die JNK-Phosphorylierung in HCC44-Zellen

Im Nachfolgenden wird die Phosphorylierung von JNK abhängig von den transfizierten Proteinen EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b in HCC44-Zellen analysiert. In der Westernblotanalyse zeigte der Vergleich der EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen mit der Kontrolle in zwei von drei Versuchen eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung der JNK-Kinase. Der dargestellte Westernblot veranschaulicht diese Beobachtung (Abb. 6). Die densitometrische Auswertung der Westernblots (n=3) ergab einen Mittelwert von 1,81 (SD $\pm$ 1,05). Diese Ergebnisse gaben einen starken Hinweis auf eine Aktivierung der JNK-Kinase durch Rac1 in HCC44-Zellen.

Die Überexpression von EGFP-Rac1b führte in den HCC44-Zellen im Vergleich zu der Kontrolle ebenfalls zu einer Zunahme der JNK-Phosphorylierung (Abb. 6). Die densitometrische Auswertung der Banden ergab einen Mittelwert von 1,54 (SD $\pm$ 1,07) (Abb. 6, Diagramm). Sowohl für die EGFP-Rac1- als auch für die EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen war die Streuung um den Mittelwert relativ hoch. Diese muss bei der Beurteilung beachtet werden.

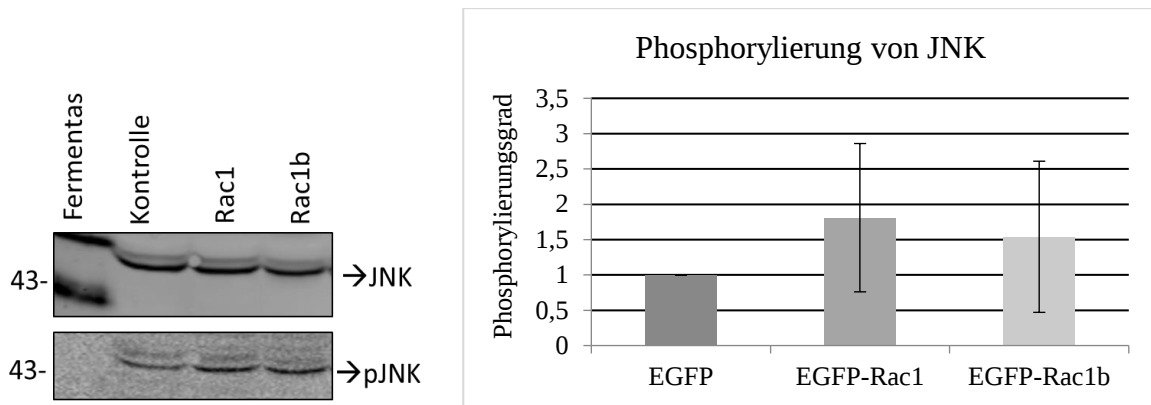


Abbildung 6: Nachweis der Phosphorylierung der Kinase JNK in HCC44-Zellen und die densitometrische Auswertung.

Der dargestellte Westernblot zeigt die Zunahme der Phosphorylierung der Kinase JNK in den EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen. Zum Vergleich werden die EGFP-exprimierenden Zellen herangezogen. Die Auswertung des densitometrischen Signals erfolgte durch die Normalisierung des Signals von phospho-JNK in Bezug auf die Gesamtmenge an JNK. Die EGFP-exprimierenden Zellen dienen als Kontrolle und werden dem numerischen Wert 1 gleichgesetzt. Der Mittelwert der densitometrischen Auswertung aller drei Assays beträgt für die EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen 1,81 (SD±1,05) und für die EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen 1,54 (SD±1,07) im Vergleich zu der Kontrolle.

3.2.2 Effekt von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die ERK-Phosphorylierung in HCC44-Zellen

Das Signalprotein ERK liegt in den Isoformen ERK1 und ERK2 vor. ERK2 hat ein Molekulargewicht von 42 kDa und ERK1 eins von 44 kDa. In den Versuchen fiel auf, dass sich mittels des gegen ERK1 und ERK2 gerichteten Antikörpers für die Isoform ERK2 dunklere Banden darstellen ließen als für ERK1. Dies spricht dafür, dass ERK2 in den HCC44-Zellen in höheren Konzentrationen vorhanden war als ERK1.

In diesem Abschnitt wird der Effekt von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die MAP-Kinase ERK 2 in HCC44-Zellen beschrieben. In der Analyse der Westernblots zeigte der Vergleich der EGFP-exprimierenden-Zellen mit den EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen in allen drei durchgeführten Westernblots keine Änderung der Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK2 (Abb.7). Die densitometrische Auswertung dokumentierte für die Phosphorylierung von ERK2 in den EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen einen Mittelwert von 0,85 (SD± 0,12) und im Fall der EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen einen Mittelwert von etwa 0,96 (SD±0,02) je nach Normalisierung des Signals von phospho-ERK2 auf die Gesamtmenge von ERK2. Beide Werte weisen auf eine unveränderte Phosphorylierung der Kinase hin.

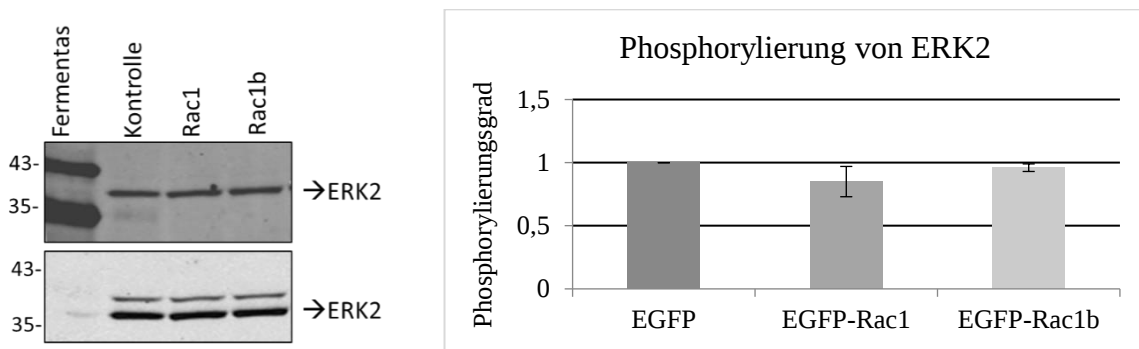


Abbildung 7: Immunblot zum Nachweis der Phosphorylierung der ERK-Kinase; densitometrischer Nachweis der ERK2-Phosphorylierung.

Jede Gelspur ist mit 50ug Protein beladen. Die aktivierte Form der ERK2-Kinase wurde mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers dargestellt. Es wird repräsentativ ein Westernblot der Versuchsreihe von drei unabhängigen Westernblots dargestellt. Dieser zeigt die gleichbleibende Phosphorylierung von ERK2 in Abhängigkeit der Überexpression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b. Der Graph stellt die densitometrische Auswertung der drei durchgeführten Westernblots dar. Abgebildet sind hier die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. Das Signal der Banden für phospho-ERK2 wurde auf das Signal von Gesamt-ERK2 normalisiert und in Bezug zu der Kontrollgruppe gesetzt.

3.2.3 Effekt von Rac1 und Rac1b auf die p38-Phosphorylierung in HCC44-Zellen

Die folgende Analyse beinhaltet die Auswirkungen von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 in HCC44-Zellen. Das Protein p38 wird in allen transfizierten HCC44-Zellen exprimiert und kann der Bande von 38 kDa zugeordnet werden. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt.

Die transiente Überexpression von EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b in den HCC44-Zellen führte nicht zu einer Phosphorylierungsänderung der MAP-Kinase p38 (Abb.8). Die densitometrische Auswertung der Färbungen ergab nach Normalisierung des Signals von phospho-p38 auf die Gesamtmenge von p38 in Bezug zur Kontrolle einen Mittelwert von etwa 1,24 ($SD \pm 0,43$) für EGFP-Rac1- und von 1,07 ($SD \pm 0,53$) für die EGFP-Rac1b-exprimierenden HCC44-Zellen. Diese Beobachtungen sprechen für eine unveränderte Phosphorylierung von p38 nach der Überexpression von EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b in den HCC44-Zellen.

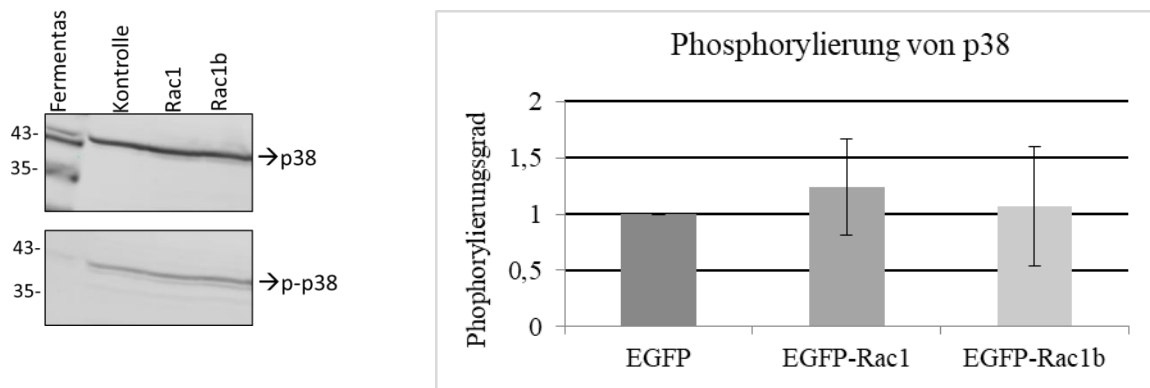


Abbildung 8: Immunblot zum Nachweis der Phosphorylierung der p38-Kinase und densitometrische Auswertung.

Jede Spur ist mit 50 µg Protein beladen. Die aktivierte Form der p38-Kinase wurde mittels eines phosphospezifischen Antikörpers dargestellt. Die Gesamtmenge des Proteins in den einzelnen Spuren wurde mittels eines gegen p38 gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Der repräsentativ ausgewählte Westernblot veranschaulicht die gleichbleibende p38-Phosphorylierung unter der Überexpression von EGFP-Rac oder EGFP-Rac1b. Das Säulendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung der durchgeführten Westernblots (n=4). Es wurde die Signalintensität der Banden hinsichtlich der Menge von Phospho-p38 in den untersuchten Zellproben in Bezug auf Gesamtmenge von p38 ausgewertet. Als Bezug dient die EGFP-Kontrolle, diese wird dem numerischen Wert 1 gleichgesetzt. Anhand des Diagramms erkennt man, dass die Werte eine gleichbleibende Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 aufweisen.

3.2.4 Effekt von EGFP-Rac1/-Rac1b auf die Phosphorylierung von AKT in HCC44-Zellen

In diesem Abschnitt werden die Effekte von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die Phosphorylierung und Aktivität der Kinase AKT vorgestellt. Mittels dreier Westernblots wurde die Änderung der Phosphorylierung von AKT in EGFP-Rac1-/Rac1b-exprimierenden Zellen im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Zellen analysiert. In den Westernblots fiel für die EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle keine Änderung der Bandenintensität auf (Abb. 9). Die densitometrische Auswertung ergab für die EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen einen Mittelwert von 1,02 (SD±0,17) und für die EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen einen Mittelwert von 1,0 (SD±0,14) (Abb. 9). Zusammenfassend ergibt sich daraus, dass es weder unter dem Einfluss von EGFP-Rac1 noch unter EGFP-Rac1b zu einer Änderung der Phosphorylierung von AKT gekommen ist.

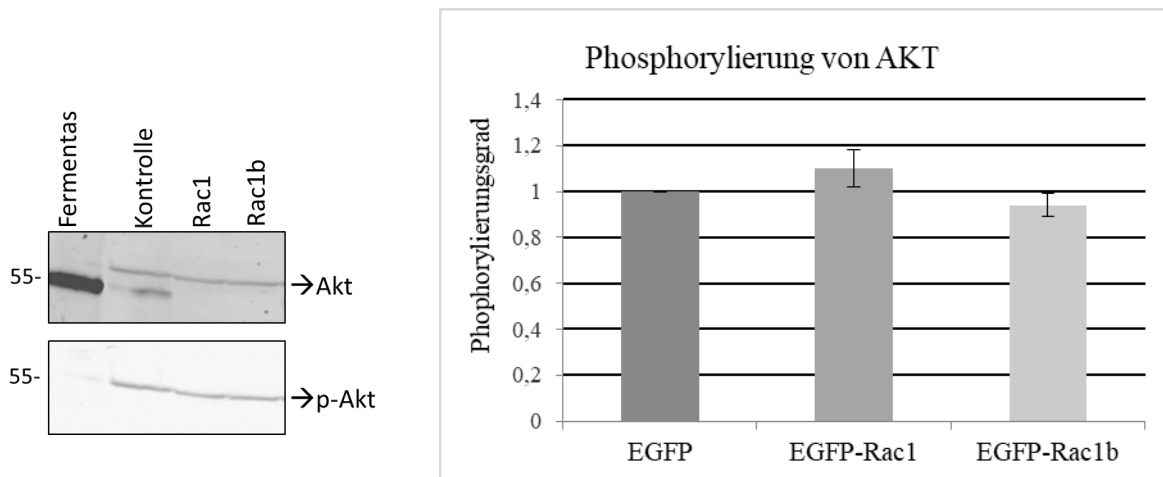


Abbildung 9: Immunblot zum Nachweis der Phosphorylierung der AKT-Kinase und densitometrische Auswertung.

Jede Spur ist mit 50 µg Protein beladen. Das Molekulargewicht von AKT liegt bei 56 kDa. Die aktivierte Form der AKT-Kinase wurde mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers dargestellt. Die Gesamtmenge und die Beladung der einzelnen Spuren wurde mittels eines gegen AKT gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Der ausgewählte Westernblot stellt das Ergebnis der Analyse repräsentativ dar. Man erkennt die gleichbleibende Phosphorylierung der Kinase AKT unter dem Einfluss von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b. In dem dargestellten Westernblot ist die Gesamtproteinmenge für EGFP-Rac1b geringer als bei der Kontrolle und daher die Bande für die phosphorylierte Form des Proteins heller, sodass das nicht als Abnahme der AKT-Phosphorylierung gewertet wird. Das Säulendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung aller Westernblots $n=3$ und stellt die Mittelwerte mit Standardabweichung dar.

3.3 Effekt einer TGF β -Stimulation auf MAP-Kinasen und AKT in HCC44-Zellen

In dem folgenden Abschnitt wird der Effekt der TGF β -Stimulation auf die Kinasen JNK, ERK, p38 und AKT untersucht. Es wurden die mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen mit der ebenfalls mit TGF β -stimulierten HCC44-Kontrollgruppe verglichen. Mittels dieses Vergleichs wurden mögliche additive Effekte von TGF β 1 und Rac1 oder Rac1b exploriert. Ein weiterer Vergleich wurde zwischen den mit TGF β -stimulierten EGFP-exprimierenden Zellen und der EGFP-Kontrolle gezogen. Hierdurch wurde der Effekt von TGF β auf die HCC44-Zellen untersucht. Um den alleinigen TGF β -Effekt zu untersuchen, wurden die TGF β -stimulierten EGFP-Rac1/-Rac1b-exprimierenden Zellen mit den nicht-stimulierten EGFP-Rac1/-Rac1b-exprimierenden Zellen verglichen. In den folgenden Ausführungen werden die EGFP-exprimierenden Zellen als Kontrolle bezeichnet und die mit TGF β -stimulierten EGFP-exprimierenden Zellen als TGF β -stimulierte Kontrolle.

3.3.1 Effekt der TGF β -Stimulation auf die Kinase JNK in HCC44-Zellen

Dieser Abschnitt behandelt die Auswirkung der Stimulation mit TGF β (10ng/ml für 2h) auf die Phosphorylierung der JNK-Kinase in HCC44-Zellen. Dazu wurden die mit TGF β -stimulierten EGFP-exprimierenden Zellen (Spur 4 in Abb.10) mit der nicht-stimulierten Kontrolle verglichen. In zwei der drei Westernblots kam es zu einer Phosphorylierungszunahme von JNK unter TGF β -Stimulation. Dieses Ergebnis spiegelt sich in der densitometrischen Auswertung mit einem Mittelwert einer 1,78-fachen Stimulation ($SD \pm 1,51$) wider (Tab. 8). Anhand dieser Beobachtungen wird von einem aktivierenden Einfluss von TGF β auf die JNK-Kinase in HCC44-Zellen ausgegangen (Abb. 10).

Die Stimulation mit TGF β führte in Kombination mit der Überexpression von Rac1 oder Rac1b im Vergleich zu der stimulierten Kontrolle allerdings nicht zu einer stärkeren Aktivierung der Kinase JNK. Dies zeigten die Vergleiche zwischen den jeweils mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen und den mit TGF β -stimulierten EGFP-Zellen (Abb. 10). Die densitometrische Auswertung erbrachte für die Phosphorylierung von JNK in EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen unter TGF β -Stimulation in Bezug zu den TGF β -stimulierten EGFP-exprimierenden Zellen einen Mittelwert von 0,91 ($SD \pm 0,16$) und für die TGF β -stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen einen Mittelwert um 0,79 ($SD \pm 0,07$) (Tab.8).

Als nächstes wurden die mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen mit den nicht-stimulierten EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen verglichen. Anhand dieser Vergleiche sollte die Auswirkung von TGF β auf die mit pEGFP-Rac1 oder pEGFP-Rac1b-transfizierten Zellen beurteilt werden. Die Vergleiche zeigten eine leichte Abnahme der Phosphorylierung der Kinase JNK in den mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen. Diese Beobachtung wurde jeweils in zwei der drei durchgeführten Westernblots gemacht (Abb.10). Die densitometrische Auswertung der TGF β -stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen in Bezug zu den EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen erbrachte einen Mittelwert von 0,86 ($SD \pm 0,28$). Die densitometrische Auswertung für die Zellen unter Rac1b- Einfluss ergab einen Mittelwert von 0,84 ($SD \pm 0,06$) (Tab.8).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass TGF β in den EGFP-exprimierenden Zellen eine Zunahme der JNK-Phosphorylierung in HCC44-Zellen bewirkte. Die Stimulation mit TGF β in den EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen führte

allerdings zu keiner Zunahme der Phosphorylierung der JNK-Kinase. Vielmehr löst die Überexpression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b eine Aktivierungszunahme der Kinase aus (siehe Kapitel 3.2.1). Die Zellen, die sowohl EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b exprimierten als auch eine TGF β -Stimulation erfahren haben, zeigten keine weitere Zunahme der JNK-Phosphorylierung verglichen mit der JNK-Phosphorylierung der HCC44-Zellen mit Rac1 bzw. Rac1b-Expression oder TGF β -Stimulation.

Tabelle 8: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase JNK (n=3). Die Darstellung als Bruch soll verdeutlichen, welche Proben zueinander in Bezug gesetzt werden.

Status	Mittelwert	Standardabweichung $\pm$
$\frac{EGFP + TGF\beta}{EGFP}$	1,78	1,15
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	0,91	0,16
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	0,79	0,07
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP}$	1,68	1,61
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP - Rac1}$	0,86	0,28
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP}$	1,34	1,04
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP - Rac1b}$	0,84	0,06

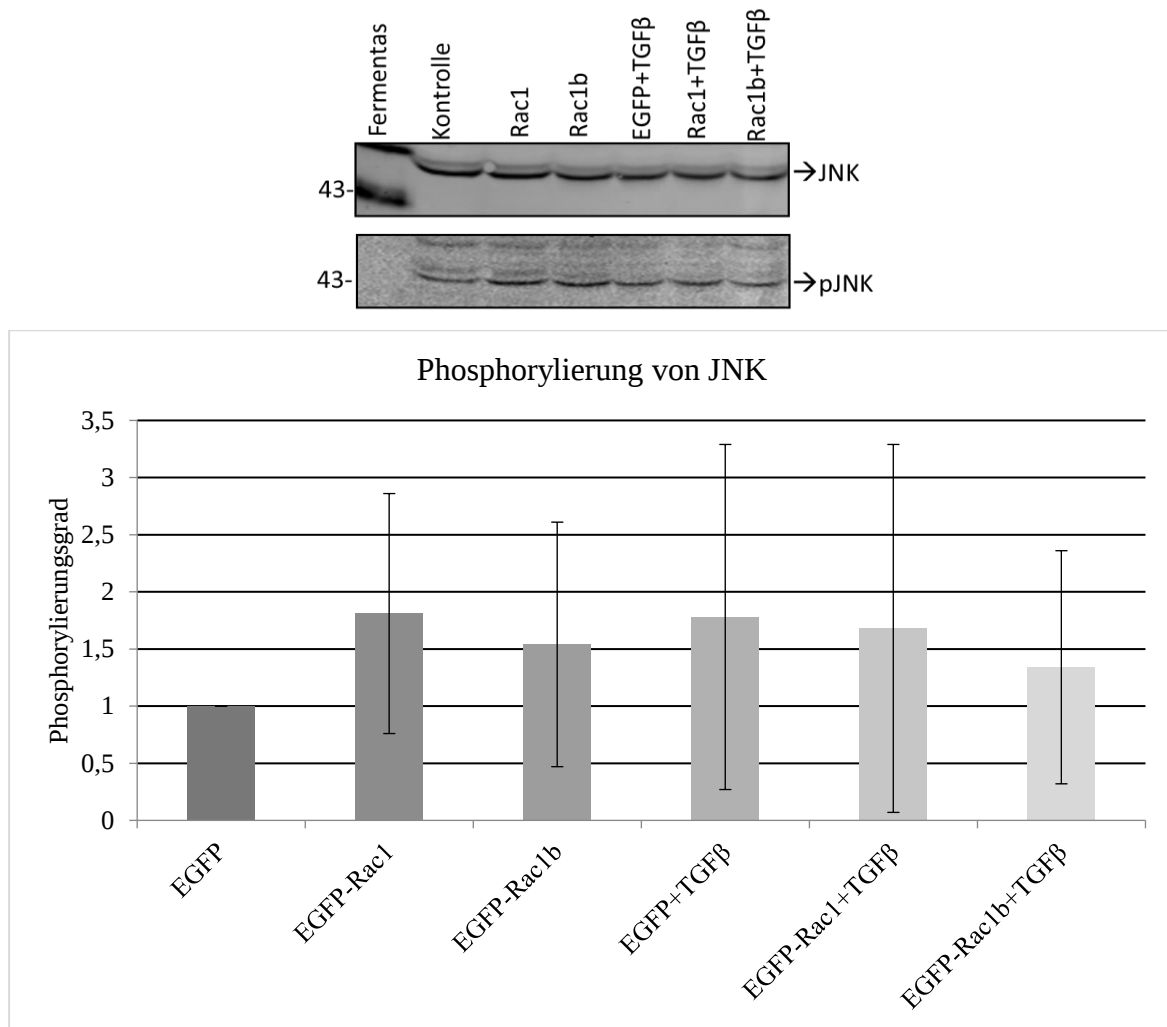


Abbildung 10: Nachweis der Phosphorylierung der Kinase JNK in HCC44-Zellen und die densitometrische Auswertung.

Die Abbildung zeigt vollständigkeithalber neben der Auswirkung von TGFβ die bereits in Abbildung 6 gezeigten Auswirkungen der Überexpression von Rac1 und Rac1b auf die Kinase JNK. Anhand der Banden erkennt man einen aktivierenden Einfluss von TGFβ auf JNK in den EGFP-exprimierenden Zellen. Außerdem zeigt sich eine Zunahme der JNK-Phosphorylierung in den mit pEGFP-Rac1 oder pEGFP-Rac1b-transfizierten Zellen (bereits in Abb. 6 beschrieben). Eine Zunahme der JNK-Phosphorylierung unter TGFβ-Stimulation und gleichzeitiger Überexpression von Rac1 oder Rac1b im Rahmen additiver Effekte ist in den Zellen nicht zu verzeichnen. Die densitometrische Auswertung zeigt unter Berücksichtigung der breiten Streuung um den Mittelwert eine Zunahme der JNK-Phosphorylierung als TGFβ-Effekt in den EGFP-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Das Diagramm veranschaulicht ebenfalls, dass TGFβ in den EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen keine Auswirkung auf die JNK-Phosphorylierung im Vergleich zur alleinigen Überexpression von Rac1 oder Rac1b hat. Einen additiven Effekt im Rahmen einer gleichzeitigen TGFβ-Stimulation und Überexpression von Rac1 bzw. Rac1b in den Zellen ist auch anhand der densitometrischen Auswertung nicht zu verzeichnen. In diesem Vergleich ist keine weitere Zunahme der JNK-Phosphorylierung zu erkennen.

3.3.2 Effekt der TGF β -Stimulation auf ERK2 in HCC44-Zellen

Es wurde die Auswirkung der Stimulation mit TGF β auf die Phosphorylierung des Signalproteins ERK2 untersucht. Zuerst wurden dazu die jeweils mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen mit den mit TGF β -stimulierten EGFP-exprimierenden Zellen hinsichtlich der ERK2-Phosphorylierung verglichen. In beiden Fällen kam es nicht zu einer Zunahme der ERK2 Kinaseaktivität (Abb. 11). Die densitometrische Auswertung ergab für die TGF β -stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen in Bezug zu der stimulierten Kontrolle einen Mittelwert von 0,96 (SD $\pm$ 0,15). Für die mit TGF β -stimulierten und Rac1b-überexprimierenden Zellen ergab die densitometrische Auswertung in Bezug zu der stimulierten Kontrolle einen Mittelwert von 0,94 (SD $\pm$ 0,37). Eine Behandlung mit TGF β führte auch in den EGFP-exprimierenden Zellen verglichen mit der Kontrolle nicht zu einer Änderung der ERK2-Phosphorylierung. Die densitometrische Auswertung lieferte einen Mittelwert von 1,23 (SD $\pm$ 0,1) (Tab. 9).

Als Nächstes wurde die alleinige Auswirkung der TGF β -Stimulation auf EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierende Zellen untersucht. Der Vergleich der mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen mit den EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen zeigte in der Auswertung der Westernblots keine Aktivitätsänderung der Kinase (Abb.11). Die densitometrische Auswertung der zugehörigen Banden ergab einen Mittelwert von 1,31 (SD $\pm$ 0,33) (Tab. 9), sodass anhand der densitometrischen Auswertung eine leichte Zunahme der Phosphorylierung von ERK nach der TGF β -Stimulation möglich ist. Demselben Vergleich wurden die mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen unterzogen. Dieser ergab keine Änderung der ERK2-Phosphorylierung unter TGF β -Einfluss (Abb. 11). Der densitometrisch ermittelte Mittelwert für die TGF β -stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen in Bezug zu den nicht-stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen war 1,11 (SD $\pm$ 0,33) (Tab. 9).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass weder Rac1 oder Rac1b noch TGF β oder beide Faktoren in Kombination zu einer Zunahme der Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK2 führen.

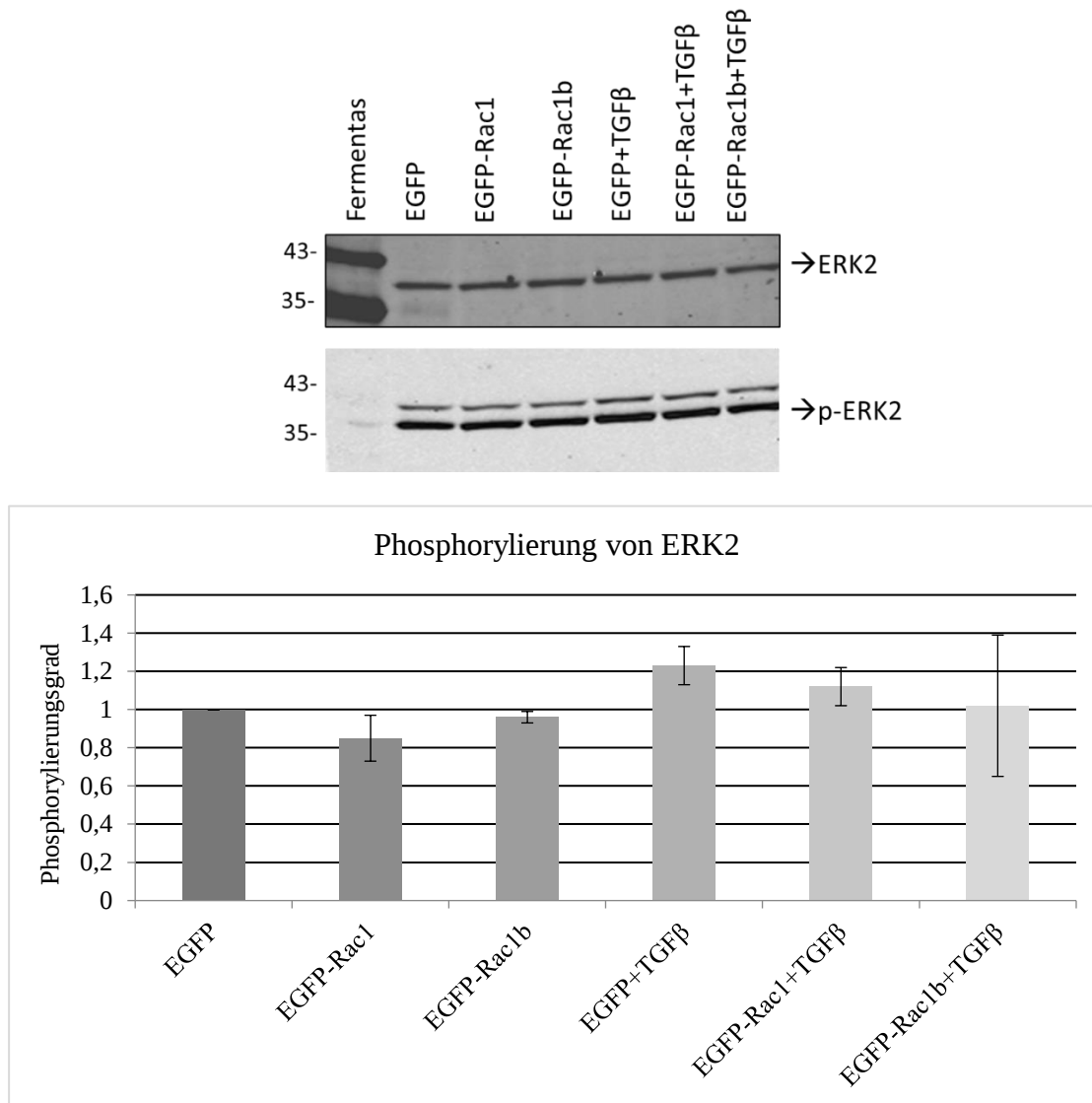


Abbildung 11: Westernblot zur Darstellung der Auswirkung der TGFβ-Stimulation auf die Kinase ERK 2, densitometrische Auswertung der Bandenfärbung.

Eine Behandlung mit TGFβ führte weder als alleiniger Faktor noch bei gleichzeitiger Überexpression von EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b im Sinne additiver Effekte zu einer Aktivierung der ERK 2-Kinase in HCC44-Zellen. Diese Abbildung zeigt sowohl den TGFβ-vermittelten Einfluss auf die MAP-Kinasen-Phosphorylierung als auch den Einfluss von Rac1 und Rac1b. Das Säulendiagramm dient zur Veranschaulichung der densitometrischen Auswertung der durchgeführten Westernblots (n=3).

Tabelle 9: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase ERK.

Status	Mittelwert	Standardabweichung $\pm$
$\frac{EGFP + TGF\beta}{EGFP}$	1,25	0,09
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	0,96	0,15
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	0,94	0,37
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP}$	1,12	0,1
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP - Rac1}$	1,31	0,33
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP}$	1,02	0,37
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP - Rac1b}$	1,11	0,33

3.3.3 Effekt der TGF β -Stimulation auf die MAP-Kinase p38 in HCC44-Zellen

Im folgenden Abschnitt wird die Auswirkung der Stimulation mit TGF β auf die MAP-Kinase p38 in Abhängigkeit von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b betrachtet.

Die TGF β -Stimulation führte in den EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen verglichen mit der p38-Phosphorylierung in den mit TGF β -stimulierten EGFP-exprimierenden Zellen nicht zu einer nennenswerten Zunahme der Kinasenphosphorylierung. Die densitometrische Auswertung dieses Vergleichs ergab für die stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen einen Mittelwert von 0,95 (SD $\pm$ 0,4), für die stimulierten EGFP-Rac1b einen gemittelten Wert von 0,91 (SD $\pm$ 0,33) (Tab. 10). TGF β bewirkte in den EGFP-exprimierenden Zellen in zwei von vier durchgeführten Westernblots im Vergleich zur Kontrolle zu einer Zunahme der Phosphorylierung der MAP-Kinase p38. Allerdings lieferte die densitometrische Auswertung der vier Werte einen Mittelwert von 1,15 (SD $\pm$ 0,33), der keine Änderung der Kinaseaktivität markiert. Die Ergebnisse wurden insgesamt dahingehend gewertet, dass TGF β in den EGFP-exprimierenden Zellen zu keiner Zunahme der p38-Phosphorylierung führt.

Als Nächstes wurde der alleinige Effekt der TGF β -Stimulation auf die EGFP-Rac1- oder EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen untersucht. Dazu wurden die mit pEGFP-Rac1-

oder pEGFP-Rac1b-transfizierten und mit TGF β -stimulierten Zellen mit den nicht-stimulierten EGFP-Rac1-/EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen verglichen. In beiden Zellproben führte TGF β nicht zu einer Aktivierung der MAP-Kinase p38. Die aus der Densitometrie ermittelten Werte lauteten für die stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen MW=0,91 (SD $\pm$ 0,30) und für die stimulierten EGFP-Rac1b- exprimierenden Zellen MW= 1,03 (SD $\pm$ 0,39) (Tab. 10). Die Werte sprechen für eine unveränderte Phosphorylierung von p38 unter Einfluss von TGF β in HCC44-Zellen (Abb.12).

Tabelle 10: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase p38.

Status	Mittelwert	Standardabweichung $\pm$
$\frac{EGFP + TGF\beta}{EGFP}$	1,15	0,33
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	0,95	0,4
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	0,91	0,33
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP}$	1,05	0,22
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP - Rac1}$	0,91	0,3
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP}$	1,05	0,45
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP - Rac1b}$	1,03	0,39

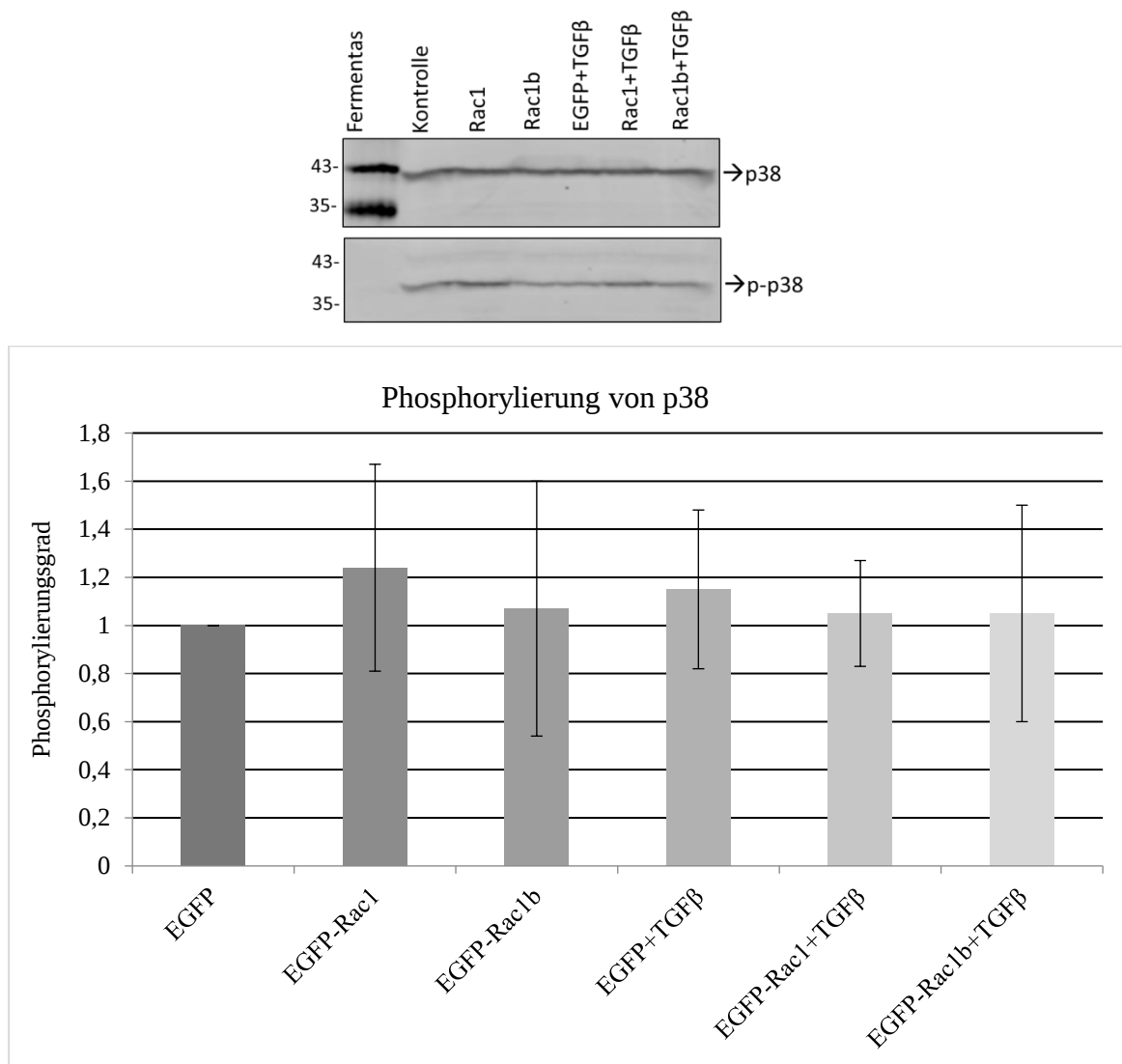


Abbildung 12: Westernblot zur Darstellung der Auswirkung der TGFβ-Stimulation auf die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38.

In den Versuchen (n=4) zur Phosphorylierung der Kinase p38 wurden für fast alle untersuchten Zellproben uneinheitliche Ergebnisse erzielt. In der Gesamtheit der Ergebnisse kann allerdings zusammengefasst werden, dass eine TGFβ-Stimulation keine signifikante Änderung der Phosphorylierung der Kinase p38 ergab. Der dargestellte Westernblot zeigt für die TGFβ-stimulierten als auch nicht-stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen eine Zunahme der Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle. Dieser ist allerdings nicht repräsentativ. Für die stimulierten EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen konnte in der Gesamtheit der Westernblots keine Zunahme der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Die densitometrische Auswertung zeigt ebenfalls eine gleichbleibende Phosphorylierung von p38 unter dem Einfluss von TGFβ.

3.3.4 Effekt der TGFβ- Stimulation auf AKT in HCC44-Zellen

In diesem Kapitel werden die Auswirkungen der TGFβ-Stimulation auf die Phosphorylierung der Kinase AKT untersucht. Zuerst wurden die TGFβ-stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen mit der stimulierten Kontrolle hinsichtlich einer Änderung der AKT-Phosphorylierung verglichen. In zwei von drei Westernblots konnte beobachtet werden, dass die Phosphorylierung der AKT-Kinase in den mit TGFβ-

stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen geringer war als in den mit TGF β -stimulierten Kontrollzellen. Die densitometrische Auswertung ergab für diesen Vergleich jedoch einen Mittelwert von 0,98 (SD $\pm$ 0,22) (Abb.13, Tab. 11). Dieser spricht für eine gleichbleibende AKT-Phosphorylierung.

Der Vergleich zwischen den mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen und der mit TGF β -stimulierten Kontrolle ergab keine Änderung der AKT-Phosphorylierung (Abb.13). Korrespondierend zu der Westernblotanalyse zeigte auch die densitometrische Auswertung der AKT-Phosphorylierung in TGF β -stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen in Bezug zu den TGF β -stimulierten EGFP-exprimierenden Zellen bei einem Mittelwert von 1 (SD $\pm$ 0,11) keine Phosphorylierungsänderung.

Daraufhin wurde untersucht, ob TGF β in den EGFP-exprimierenden Zellen zu einer Zunahme der AKT-Aktivierung führt. Dazu wurden die mit TGF β -stimulierten EGFP-exprimierenden Zellen mit der Kontrolle verglichen. In der Westernblotanalyse zeigte sich eine gleichbleibende AKT-Phosphorylierung nach TGF β -Behandlung (Abb.13). Die densitometrische Auswertung ergab nach Normalisierung des Signals von phospho-AKT auf die Gesamtmenge von AKT in Bezug zu der Kontrolle einen Mittelwert von 1,02 (SD $\pm$ 0,17) (Tab.11). Ein isolierter TGF β -Effekt auf die EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen konnte nicht beobachtet werden. Passend zu den Westernblotanalysen markierten die densitometrisch erhobenen Mittelwerte ebenfalls eine unveränderte Phosphorylierung der Kinase (Tab.11). Verglichen wurden dazu die mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1-bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen und die EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass weder die alleinige Überexpression von EGFP-Rac1/-Rac1b noch die Stimulation mit TGF β in den EGFP-Rac1/-Rac1b-exprimierenden HCC44-Zellen zu einer Zunahme der AKT-Phosphorylierung führen. Zellen, die sowohl eine EGFP-Rac1/-Rac1b Überexpression als auch eine TGF β -Stimulation erfahren haben, zeigen ebenfalls keine Zunahme der AKT-Phosphorylierung.

Tabelle 11: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase AKT.

Status	Mittelwert	Standardabweichung $\pm$
$\frac{EGFP + TGF\beta}{EGFP}$	1,02	0,09
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	0,98	0,22
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	1,0	0,11
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP}$	1,0	0,14
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP - Rac1}$	0,91	0,13
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP}$	1,05	0,21
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP - Rac1b}$	1,09	0,21

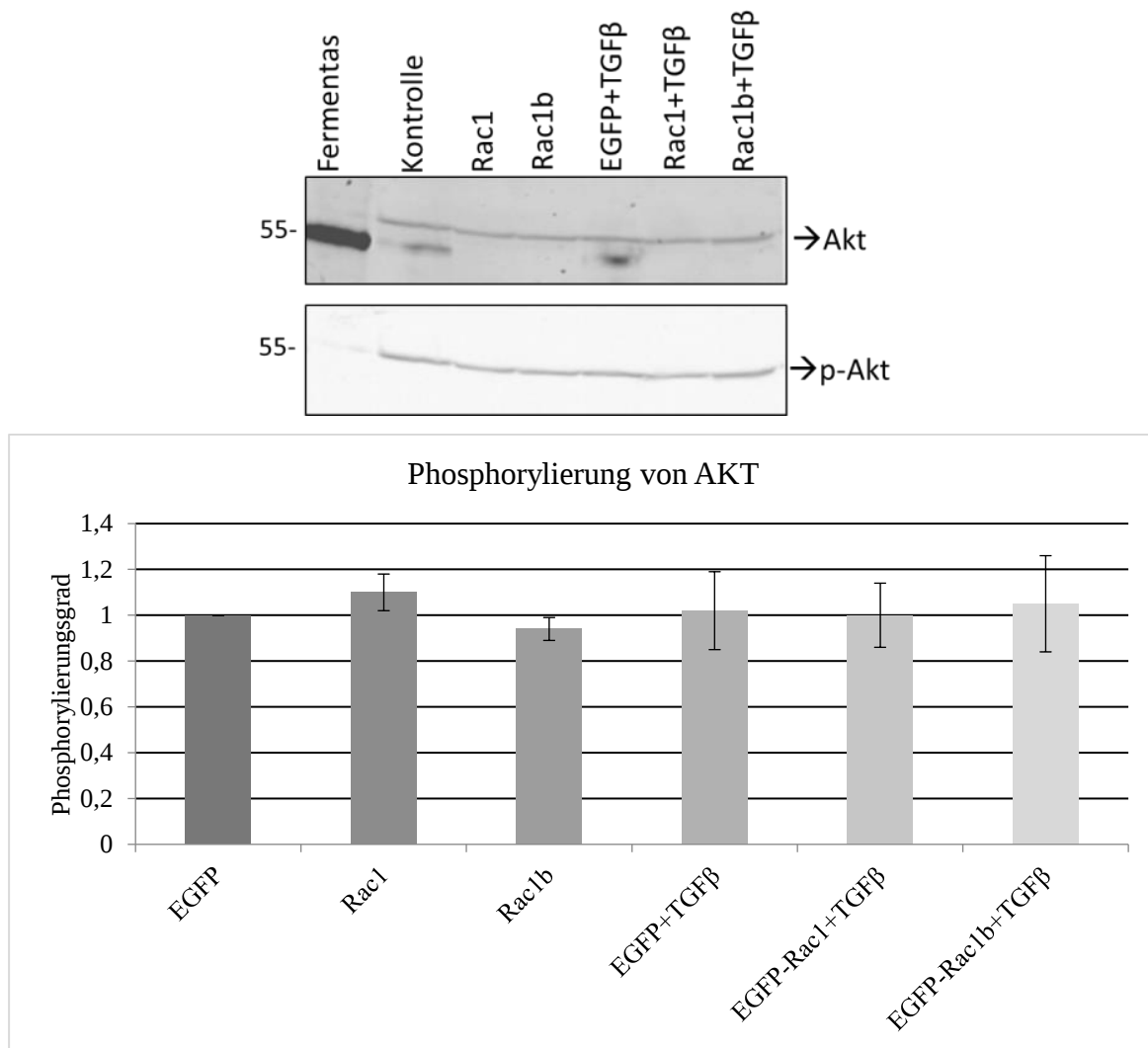


Abbildung 13: Immunblot zum Nachweis der Auswirkung von TGFβ auf die Rac1- und Rac1b-abhängige Aktivierung von AKT.

Jede Spur ist mit 50ug Protein beladen. Die aktivierte, phosphorylierte Form der AKT-Kinase wurde mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers dargestellt. Die Gesamtmenge und die Beladung der einzelnen Spuren wurde mittels eines gegen AKT gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Der dargestellte Westernblot veranschaulicht sowohl die Effekte von Rac1 bzw. Rac1b auf die Kinase AKT (s. Abb.6), als auch die Effekte der Stimulation mit TGFβ. Die Bande der mit TGFβ-stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen erscheint intensiver als die restlichen Banden. Dies ist in diesem Westernblot auf Ladungsungenauigkeiten zurückzuführen. In der Gesamtheit erkennt man, dass es unter der Stimulation mit TGFβ im Vergleich zu der stimulierten Kontrolle aber auch im Vergleich zu den übrigen Zellproben nicht zu einer stärkeren Bandenfärbung kommt. Auch das Säulendiagramm, das Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen darstellt, dokumentiert keine Aktivitätszunahme der Kinase AKT unter der Behandlung mit TGFβ sowohl im Vergleich zu der stimulierten Kontrolle im Rahmen additiver Effekte von Rac1 bzw. Rac1b und TGFβ als auch im Vergleich zu den EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen im Rahmen der alleinigen TGFβ-Auswirkung auf AKT.

3.4 Effekte von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf MAP-Kinasen und AKT in H23-Zellen

Im folgenden Kapitel geht es um die Auswirkungen der transienten Expression von Rac1 und Rac1b als EGFP-Fusionsproteine auf die MAP-Kinasen ERK, p38 und die Kinase AKT in Zellen der H23-Zelllinie. Experimentell und analytisch wurde auf die gleiche Weise verfahren wie bereits bei der HCC44-Zelllinie beschrieben (siehe Kapitel 3.1 ff.).

3.4.1 Effekt von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die MAP-Kinase ERK in H23-Zellen

Die Westernblotanalyse ergab sowohl für die EGFP-Rac1- als auch für EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen im Vergleich zu der Kontrolle keine Aktivierung der Kinase ERK. Die densitometrische Auswertung zeigte für die EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle einen Mittelwert von 1,25 ($SD \pm 0,25$) und für die EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen verglichen mit der Kontrolle einen Mittelwert von 1,11 ($SD \pm 0,34$).

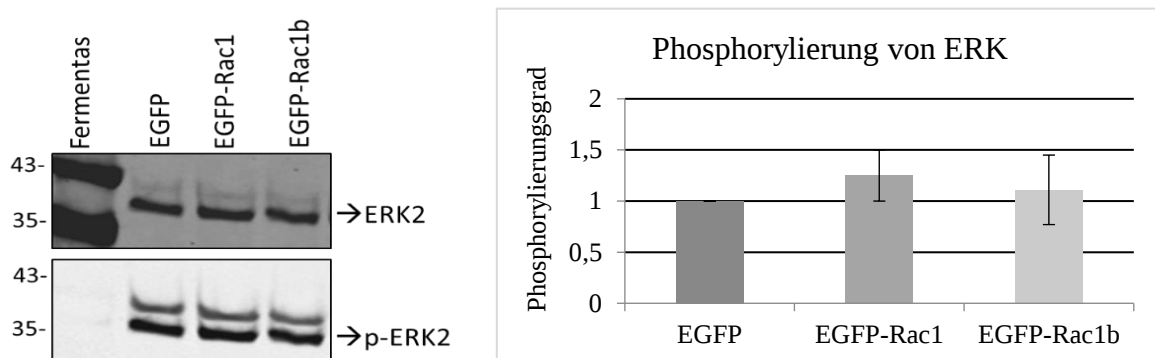


Abbildung 14: Westernblot zum Nachweis der Auswirkung einer Überexpression von EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b auf die Kinase ERK2 in H23-Zellen.

Die Kinase ERK liegt in zwei Isoformen vor. Das sind ERK1 und ERK2. Mittels des verwendeten Antikörpers konnte die Isoform ERK2 in der unphosphorylierten Form besser dargestellt werden als ERK1. Anhand der Westernblotanalyse konnte kein Phosphorylierungsunterschied abhängig von EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b gefunden werden. Das Säulendiagramm zeigt bei der densitometrischen Auswertung aller durchgeführten Westernblots $n=3$ eine gleichbleibende Phosphorylierung der Kinase ERK (ERK2). Als Kontrolle und Vergleichspartner dienten die EGFP-exprimierenden Zellen. Der Mittelwert der densitometrischen Auswertung der Banden der EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen beträgt 1,25 ($SD \pm 0,25$) und für die EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen 1,11 ($SD \pm 0,34$).

3.4.2 Effekt von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die Aktivität der Kinase p38 in H23-Zellen

Im folgenden Kapitel wird untersucht, ob die Überexpression der Proteine EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b eine Auswirkung auf die Phosphorylierung von p38 hat. In der Analyse der Westernblots konnte für die EGFP-Rac1-beziehungsweise EGFP-Rac1b-exprimierenden-Zellen keine Zu- oder Abnahme der p38-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgemacht werden (Abb.15). In der densitometrischen Auswertung erhielt man für die Banden der EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen nach Normalisierung des Signals von phospho-p38 auf die Gesamtmenge von p38 einen Mittelwert von 1,15 ($SD \pm 0,1$, $n=3$) in Bezug zur Kontrolle. Die Densitometrie aller drei Färbungen für die EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen ergab in Bezug zu der Kontrolle ebenfalls keinen Hinweis auf eine Änderung der p38-Phosphorylierung. Der Mittelwert betrug 0,96 ($SD \pm 0,22$) (Abb.15).

3.4.3 Effekt von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf AKT in H23-Zellen

Mittels der Analyse der Westernblots und anschließender densitometrischer Auswertung dieser wurde untersucht, ob die Transfektion mit pEGFP-Rac1 oder pEGFP-Rac1b im Vergleich zur Kontrolle EGFP eine Phosphorylierungsänderung der Kinase AKT bewirkt.

Für die EGFP-Rac1- und die EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen konnte im Vergleich zur Kontrolle keine Änderung der Phosphorylierung der Kinase AKT detektiert werden (Abb.13). Die densitometrische Auswertung belegte mit einem Mittelwert von 1,03 ($SD \pm 0,01$) bzw. von 0,98 ($SD \pm 0,22$) für EGFP-Rac1b eine gleichbleibende AKT-Phosphorylierung unter Einfluss von Rac1 in H23-Zellen.

Die Abbildung 16 zeigt bei gleichmäßiger Beladung (gemessen am Haushaltsprotein GAPDH) schmalere Banden der Gesamtmenge von AKT für die EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen verglichen mit der Bande für die EGFP-exprimierenden Zellen. In den weiteren Westernblots wurde diese Beobachtung nicht gemacht, sodass es sich hier am ehesten um eine experimentelle Abweichung handelt.

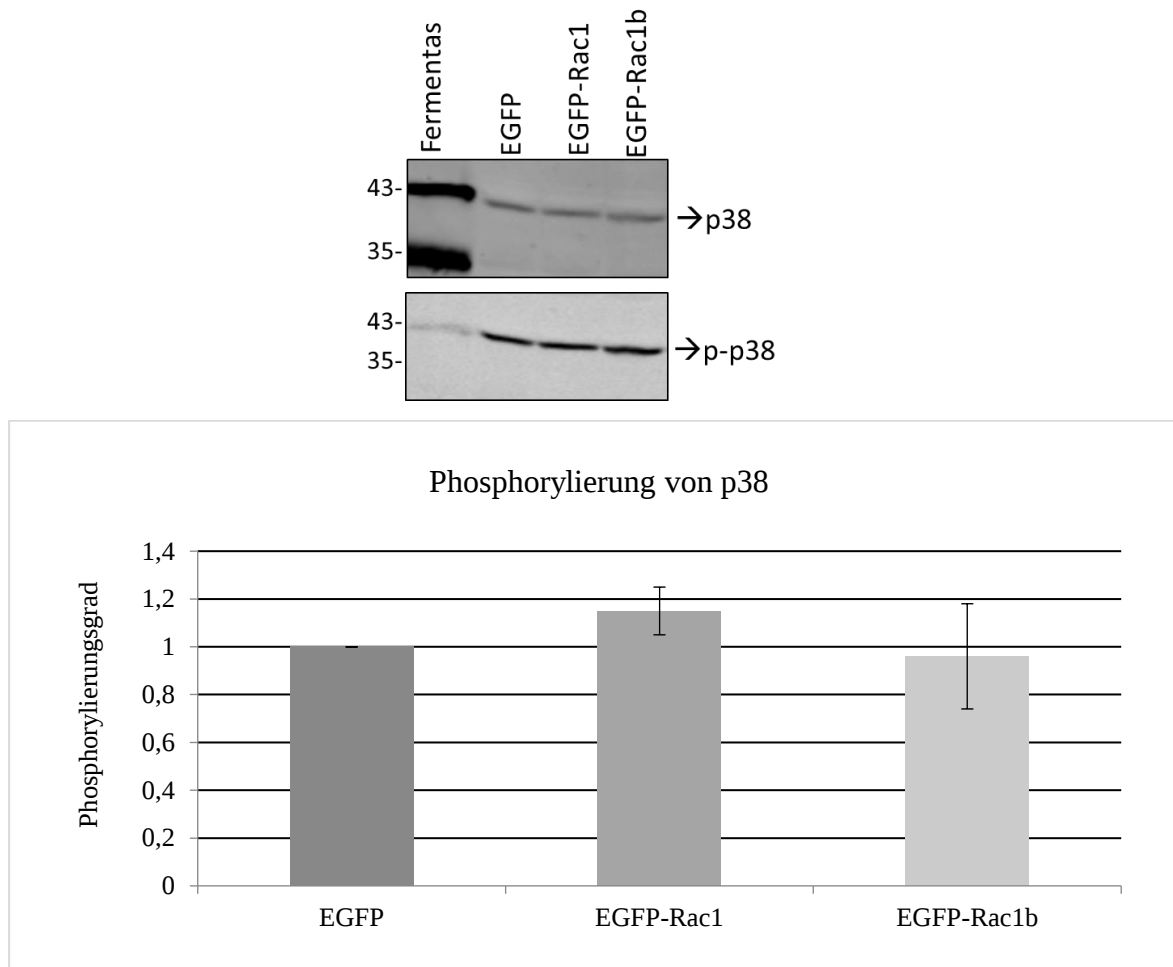


Abbildung 15: Immunblot zum Nachweis der Auswirkung der Transfektion mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 in H23-Zellen.

Jede Spur ist mit 50ug Protein beladen. Die aktivierte, phosphorylierte Form der p38-Kinase wurde mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers dargestellt. Die Gesamtmenge und die Beladung der einzelnen Spuren wurde mittels eines gegen p38 gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Der repräsentativ ausgewählte Westernblot zeigt keine Unterschiede in der Phosphorylierung von p38 innerhalb der einzelnen Proben. Das Diagramm zeigt die zum Westernblot zugehörige densitometrische Auswertung der Banden. Die Intensität des Signals von phospho-p38 wurde auf die Gesamtmenge von p38 normalisiert. Die Phosphorylierung wird an der Kontrolle EGFP gemessen. Deren Signal wird dem numerischen Wert 1 gleichgesetzt. In dem Diagramm lässt sich analog zu dem Westernblot keine signifikante Änderung der Phosphorylierung von p38 erkennen.

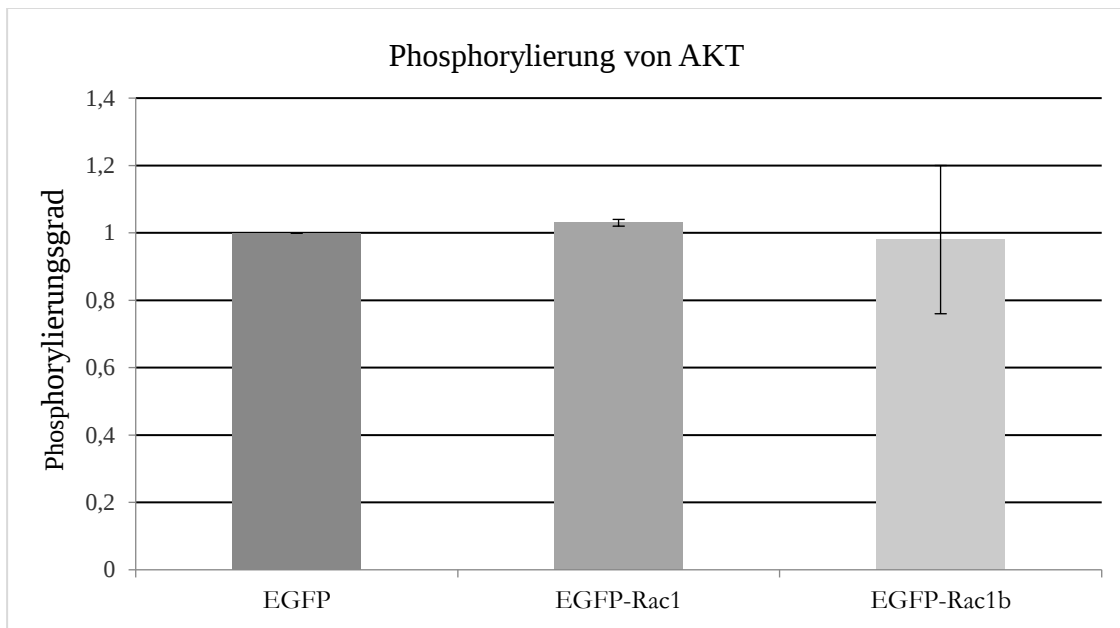
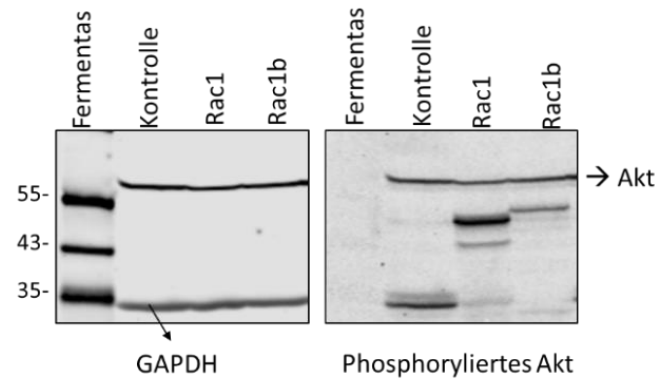


Abbildung 16: Immunblot zum Nachweis der Auswirkung der Überexpression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die Phosphorylierung der Kinase AKT in H23-Zellen.

Jede Spur ist mit 50 µg Protein beladen. Die aktivierte, phosphorylierte Form der AKT-Kinase wurde mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers dargestellt. Die Gesamtmenge und die Beladung der einzelnen Westernblotspuren wird mittels eines gegen AKT gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Der ausgewählte Westernblot zeigt anhand des Haushaltsproteins GAPDH eine gleichmäßige Beladung der Westernblotspuren. Die Färbung der Banden der EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen ist im Vergleich zur Kontrolle für die AKT-Gesamtmenge schwächer und somit auch für phospho-AKT. Diese Beobachtung wurde in weiteren Westernblot n=3 nicht gemacht und wird als experimentell bedingte Abweichung angesehen. Insgesamt kann unter einer Überexpression von sowohl EGFP-Rac1 als auch EGFP-Rac1b keine Änderung der AKT-Phosphorylierung gezeigt werden. Das Diagramm zeigt die zum Westernblot zugehörige densitometrische Auswertung der Banden. Die Intensität des Signals von phospho-AKT wurde auf die Gesamtmenge von AKT normalisiert und in Bezug zu der Kontrolle gesetzt. Diese entspricht dem numerischen Wert 1.

3.5 Effekt der TGF β -Stimulation auf die Aktivität der MAP-Kinasen und AKT in H23-Zellen

In diesem Kapitel werden die Auswirkungen der zweistündigen Stimulation mit TGF β (10ng/ml) in H23-Zellen auf die MAP-Kinasen ERK und p38 und die Kinase AKT untersucht. Gegliedert wird dieser Abschnitt in die Untersuchung des Zusammenspiels der TGF β -Stimulation und der Überexpression der transient transfizierten Proteine pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b und der alleinigen Auswirkung der Stimulation mit TGF β auf die Kinasen.

3.5.1 Effekt der TGF β -Stimulation auf die Aktivität der MAP-Kinase ERK in H23-Zellen

Als Erstes wurden die mit TGF β -stimulierten transient EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen mit der TGF β -stimulierten Kontrolle in Hinblick auf die Phosphorylierung von ERK verglichen. Für beide Zellproben konnte keine Zunahme der ERK-Phosphorylierung im Vergleich zu der stimulierten Kontrolle beobachtet werden (Abb.17, Tab.12).

Daraufhin wurde die ERK2-Phosphorylierung in den mit TGF β -stimulierten EGFP/EGFP-Rac1-/EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen im Vergleich zu der Phosphorylierung in den jeweiligen Kontrollen untersucht. Dieser Vergleich ergab eine Zunahme der ERK2-Phosphorylierung in den mit TGF β -stimulierten EGFP-exprimierenden Zellen. In der zugehörigen densitometrischen Auswertung konnte ein Mittelwert von 1,46 (SD $\pm$ 0,7) ermittelt werden (Abb.17, Tab.12). Dieser verdeutlicht die Zunahme der ERK2-Phosphorylierung durch die Behandlung mit TGF β in EGFP-exprimierenden Zellen.

Im nächsten Schritt wurde der TGF β -Effekt auf die ERK2-Phosphorylierung in EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen betrachtet und mit den nicht-behandelten EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen verglichen. Sowohl in den Zellen, in denen EGFP-Rac1 überexprimiert wurde, als auch in den mit pEGFP-Rac1b-transfizierten Zellen kam es nach der Behandlung mit TGF β nicht zu einer Änderung der Phosphorylierung (Abb.17, Tab.12).

Zusammenfassend führte TGF β in den EGFP-exprimierenden Zellen zu einer Zunahme der ERK2-Phosphorylierung. Eine Überexpression von EGFP-Rac1-/Rac1b und/oder eine

TGF β -Stimulation dieser Zellen führte nicht zu einer Zunahme der Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK2 in H23-Zellen.

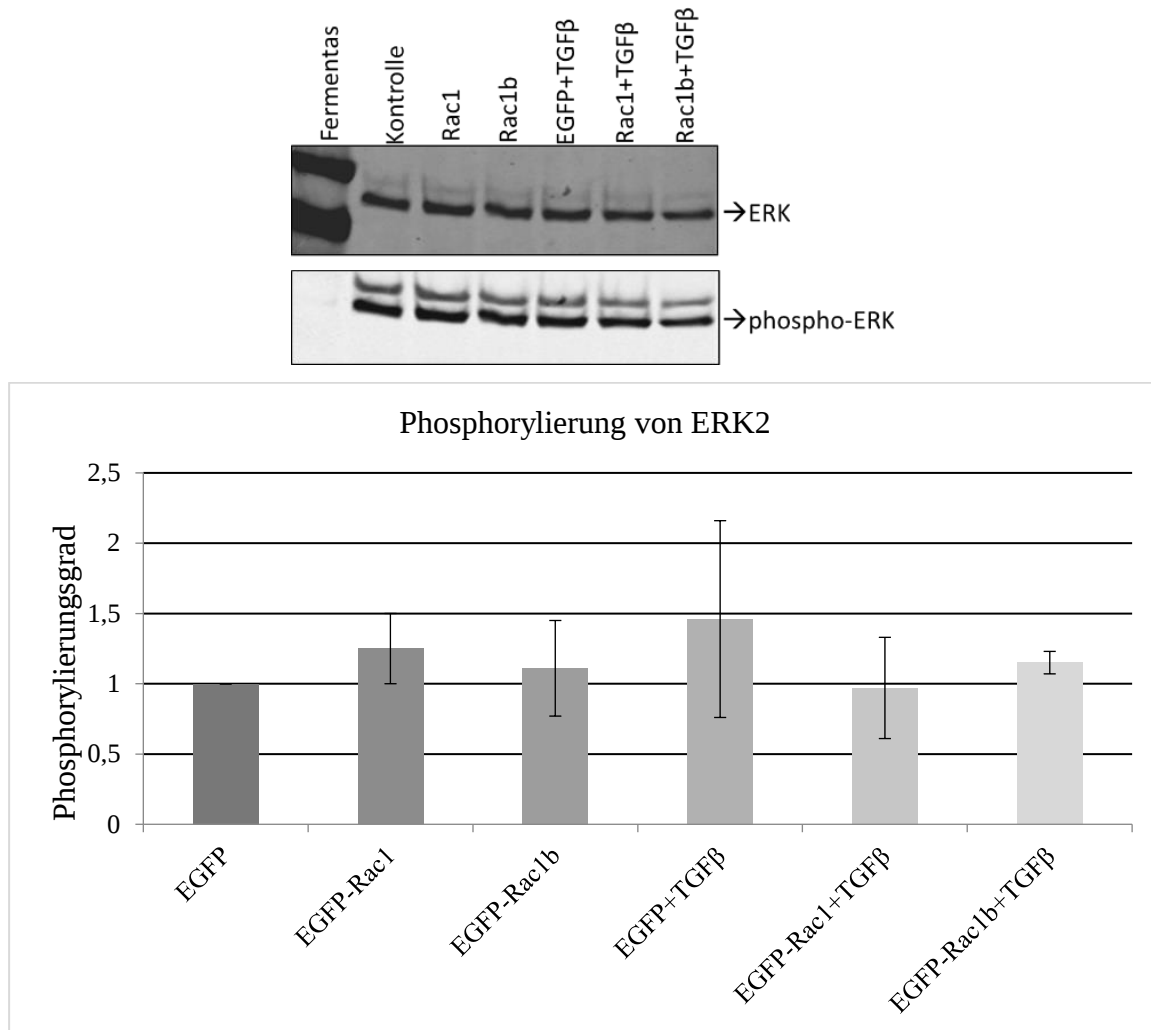


Abbildung 17: Immunblot zur Analyse der Auswirkung der TGF β -Stimulation auf die Phosphorylierung der Kinase ERK2 in H23-Zellen.

Die aktivierte, phosphorylierte Form der MAP-Kinase ERK2 wurde mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers dargestellt. Die Gesamtmenge und die Beladung der einzelnen Spuren wurden mittels eines gegen ERK gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Der ausgewählte Westernblot zeigt keine Unterschiede in den einzelnen Bandenintensitäten innerhalb der einzelnen Proben. In Zusammenschau aller Westernblots konnte eine leichte Zunahme der Phosphorylierung von ERK2 in EGFP-exprimierenden Zellen unter der TGF β -Stimulation beobachtet werden. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der durchgeführten Westernblots (n=3). Die Intensität des Signals von phospho-ERK2 wurde auf die Gesamtmenge von ERK normalisiert. Die Bezugnahme erfolgt auf die Kontrolle mit dem numerischen Wert=1. Anhand des Säulendiagramms wird deutlich, dass die Stimulation mit TGF β nur in den EGFP-exprimierenden Zellen eine Zunahme der Phosphorylierung hervorgerufen hat. Auch eine Überexpression von Rac1 bzw. Rac1b und eine gleichzeitige TGF β -Stimulation führten zu keiner weiteren Zunahme der Phosphorylierung.

Tabelle 12: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase ERK2. Die Darstellung als Bruch soll verdeutlichen, welche Proben zueinander in Bezug gesetzt werden.

Status	Mittelwert	Standardabweichung $\pm$
$\frac{EGFP + TGF\beta}{EGFP}$	1,46	0,7
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	0,7	0,42
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	0,98	0,43
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP}$	0,97	0,36
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP - Rac1}$	0,83	0,47
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP}$	1,15	0,08
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP - Rac1b}$	1,09	0,29

3.5.2 Effekt der TGF β -Stimulation auf die Aktivität der MAP-Kinase p38 in H23-Zellen

Es wird die Auswirkung von TGF β auf die MAP-Kinase p38 in transient transfizierten H23-Zellen betrachtet. Die Stimulation mit TGF β führte in den EGFP-, EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen nicht zu einer Aktivitätsänderung der Kinase p38 (Abb.18). Die densitometrische Auswertung der Färbungen (n=3) ergab für die mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen im Vergleich zu der stimulierten Kontrolle einen Mittelwert von 1,11 (SD $\pm$ 0,18) und für die mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen einen Mittelwert von 1,02 (SD $\pm$ 0,33) (Tab. 13).

In der Gesamtheit führten sowohl EGFP-Rac1 als auch EGFP-Rac1b als auch TGF β als eigenständige Faktoren in den untersuchten H23-Zellen nicht zu einer Zunahme der p38-Phosphorylierung. Auch wurde keine Zunahme der Phosphorylierung von p38 bei EGFP-Rac1 beziehungsweise EGFP-Rac1b- Überexpression und gleichzeitiger TGF β -Stimulation im Rahmen additiver Effekte festgestellt.

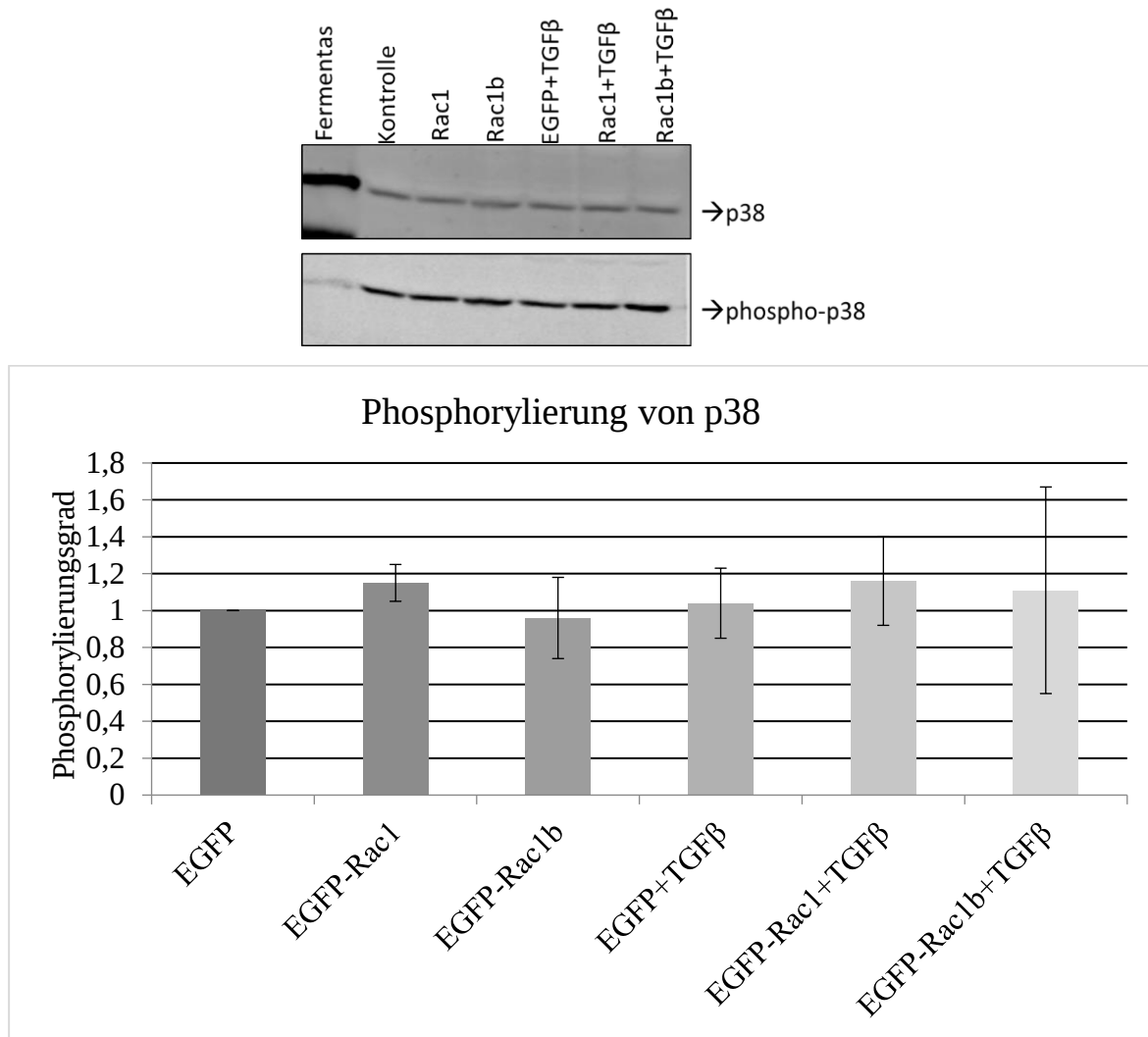


Abbildung 18: Immunblot zum Nachweis der Auswirkung der TGFβ-Stimulation auf die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 in H23-Zellen.

Betrachtet werden vor allem die letzten drei Westernblotsuren und die letzten drei Säulen des Diagramms. Die aktivierte, phosphorylierte Form der MAP-Kinase p38 wurde mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers dargestellt. Die Gesamtmenge und die Beladung der einzelnen Spuren wurde mittels eines gegen p38 gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Der repräsentativ ausgewählte Westernblot zeigt keine Unterschiede in den Intensitäten der einzelnen Banden und somit der Phosphorylierung von p38. Das Diagramm zeigt die bestimmten Mittelwerte aus der densitometrischen Auswertung der Bandenfärbungen der drei durchgeführten Westernblotversuche. Sowohl anhand des Westernblots als auch an dem Säulendiagramm erkennt man, dass die Stimulation mit TGFβ in H23-Zellen keinen Effekt auf die MAP-Kinase p38 hat.

Tabelle 13: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase p38. Die Darstellung als Bruch soll verdeutlichen, welche Proben zueinander in Bezug gesetzt werden.

Status	Mittelwert	Standardabweichung $\pm$
$\frac{EGFP + TGF\beta}{EGFP}$	1,04	0,19
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	1,11	0,18
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	1,02	0,33
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP}$	1,15	0,24
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP - Rac1}$	1,0	0,18
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP}$	1,11	0,56
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP - Rac1b}$	1,12	0,4

3.5.3 Effekt der TGF β -Stimulation auf die Aktivität der Kinase AKT

Eine 2-stündige Behandlung mit TGF β führte sowohl in den transient EGFP-Rac1- als auch EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen im Vergleich zu der stimulierten Kontrolle zu keiner Änderung der AKT-Phosphorylierung. Die densitometrische Auswertung der EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen nach der TGF β -Stimulation im Vergleich zu den mit TGF β -stimulierten EGFP-exprimierenden Zellen ergab einen gemittelten Wert (n=3) um 1,03 (SD $\pm$ 0,37). Für die mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen ergab die Densitometrie verglichen mit der stimulierten Kontrolle einen Mittelwert von 1,24 (SD $\pm$ 0,57, n=3) (Tab.14). Auch in den Zellen, die mit dem pEGFP-Plasmid transfiziert wurden, hatte eine Stimulation mit TGF β im Vergleich mit der nicht-stimulierten Kontrolle keinen Effekt auf die Phosphorylierung der Kinase AKT (Abb.19) Die densitometrische Auswertung der drei Färbungen ergab nach Normalisierung von phospho-AKT auf die Gesamtmenge von AKT einen Mittelwert von 0,99 (SD $\pm$ 0,24).

Als nächstes wurde die Auswirkung der TGF β -Stimulation auf die AKT-Kinase in pEGFP-Rac1 transfizierten Zellen untersucht. Dazu wurden die mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen mit den nicht-stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden

Zellen hinsichtlich der AKT-Phosphorylierung verglichen. In zwei der drei durchgeführten Westernblots sah man eine Aktivierung der Kinase AKT. Densitometrisch zeigte sich nur in einem der zwei Westernblots eine signifikante Zunahme der Intensität um 1,5. In dem zweiten Westernblot konnte anhand der densitometrisch ermittelten Intensität keine Zunahme der AKT-Phosphorylierung dargestellt werden (densitometrisch ermittelte Bandenintensität im Vergleich zur Kontrolle 0,9). In dem dritten Westernblot wurde weder anhand der Westernblotanalyse noch in der densitometrischen Auswertung eine Änderung der Phosphorylierung dokumentiert, wodurch ein densitometrischer Mittelwert von 1,04 ($SD \pm 0,41$) entsteht. Dieser spricht für eine unveränderte Phosphorylierung der Kinase (Abb.19). Aus diesem Grund kann nur von einer Tendenz hin zur Zunahme der Phosphorylierung unter TGF β in EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen gesprochen werden.

Bei Betrachtung aller gewonnenen Ergebnisse deuten diese darauf hin, dass TGF β allein in EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen zu einer möglichen Zunahme der AKT-Phosphorylierung führt. Ansonsten kommt es weder unter der alleinigen Überexpression von Rac1 oder Rac1b oder einer Stimulation mit TGF β zu einer Aktivierung der Kinase AKT. Auch die Kombination der Überexpression von Rac1 bzw. Rac1b und TGF β -Stimulation führten nicht zu einer Zunahme der Phosphorylierung.

Tabelle 14: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase AKT.

Protein	Mittelwert	Standardabweichung $\pm$
$\frac{EGFP + TGF\beta}{EGFP}$	0,99	0,24
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	1,03	0,37
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP + TGF\beta}$	1,24	0,57
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP}$	1,03	0,52
$\frac{EGFP - Rac1 + TGF\beta}{EGFP - Rac1}$	1,04	0,41
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP}$	1,15	0,28
$\frac{EGFP - Rac1b + TGF\beta}{EGFP - Rac1b}$	1,02	0,19

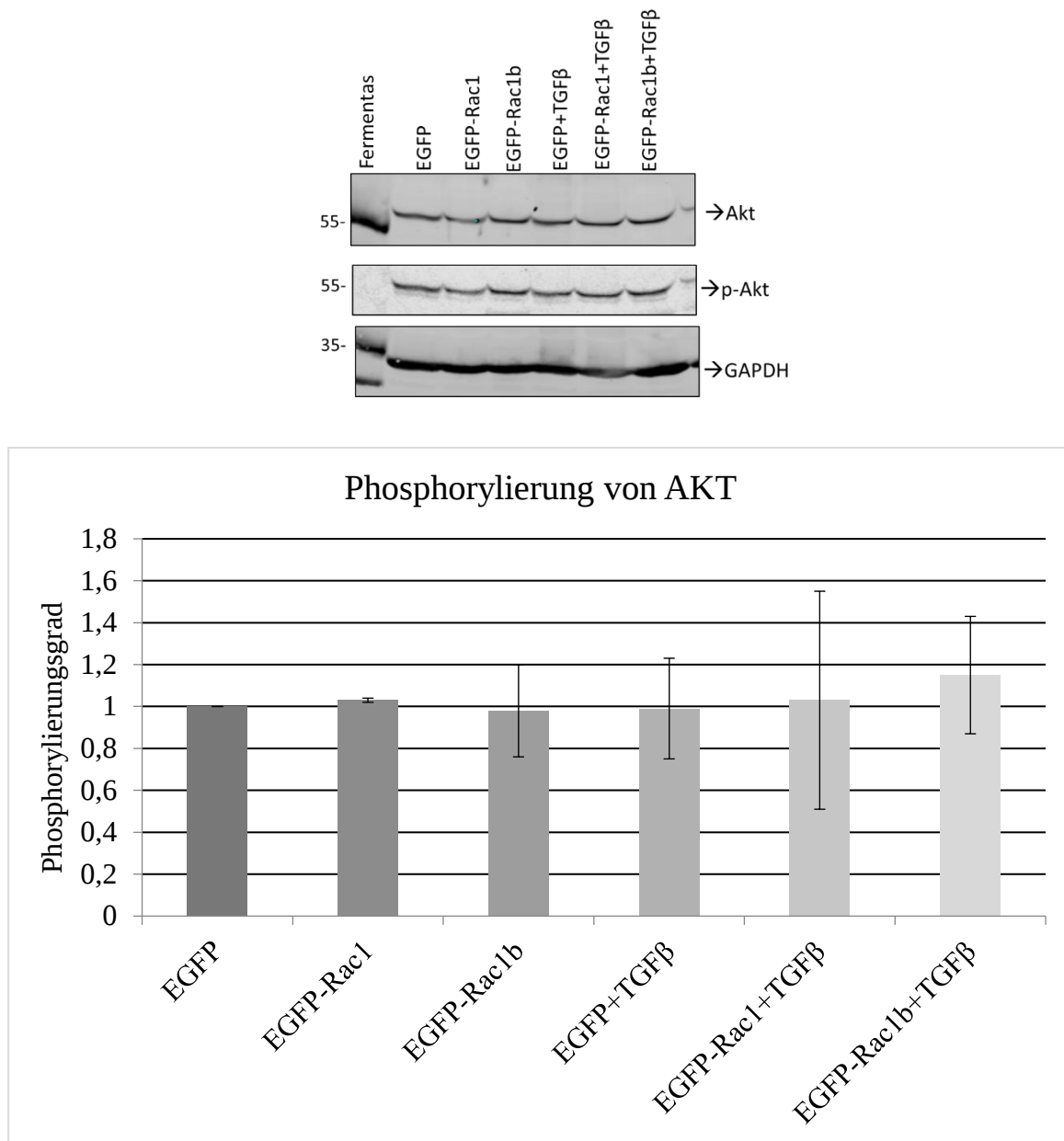


Abbildung 19: Immunblot zum Nachweis der Auswirkung der TGFβ-Stimulation auf die Phosphorylierung der Kinase AKT in H23-Zellen.

Die Zellen wurden nach erfolgreicher Transfektion für zwei Stunden mit TGFβ ($c=10\text{ng/ml}$) stimuliert. Betrachtet werden vor allem die letzten drei Westernblotsuren und die letzten drei Säulen des Diagramms. Die aktivierte, phosphorylierte Form der Kinase AKT wurde mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers dargestellt. Der ausgewählte Westernblot dokumentiert diskrete Unterschiede der einzelnen Banden in dem Nachweis für phospho-AKT und in Gesamt-AKT. Unterschiede zwischen der nicht-phosphorylierten Form von AKT und der phosphorylierten wurden allerdings nicht gesehen. Die Beladung gemessen an GAPDH ist annähernd regelmäßig. In dem Säulendiagramm, welches die densitometrische Auswertung der Färbungen als Mittelwerte aller durchgeführten Westernblots zeigt, erkennt man, dass die Mittelwerte für die Phosphorylierung von AKT trotz Stimulation mit TGFβ und Überexpression von EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b keinen eindeutigen Änderungen unterliegen.

3.6 Auswirkungen der stabilen Transfektion mit pEGFP-Rac1/-Rac1b auf die Kinasen p38 und AKT in HCC44-Zellen

Zellen der HCC44-Zelllinie wurden mit folgenden Plasmiden stabil transfiziert: pEGFP, pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b. Mit der stabilen Transfektion sollte erreicht werden, dass die Zellen das Plasmid in ihr Genom integrieren und replizieren. Man erhielt so Zellen, in denen die Proteine EGFP, EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b dauerhaft exprimiert wurden. Auf diese Weise sollte untersucht werden, welche Langzeitwirkungen die Überexpression von Rac1 und Rac1b auf die Kinasen p38 und AKT in HCC44-Zellen hat. Es wurden ein EGFP-exprimierender Zellklon, der als Kontrolle diente und je zwei pEGFP-Rac1- (C4 und D6.2) und pEGFP-Rac1b-exprimierende (D5 und D2.1) Zellklone als stabile Zelllinie etabliert.

Die zu analysierenden Proteine Rac1 und Rac1b sind an das grün-fluoreszierende EGFP fusioniert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte anhand der grün-fluoreszierenden Zellen beurteilt werden, ob die Transfektion erfolgreich war. Mittels eines gegen GFP-gerichteten Antikörpers konnte die Präsenz der Fusionsproteine im Westernblot gezeigt werden. Die Intensität der EGFP-Bande in den verschiedenen Lysaten lässt auf eine vergleichbare Menge ekto exprimierten Fusionsprotein schließen (Abb.20). Anhand des Haushaltsproteins GAPDH wurde die Beladung der einzelnen Spuren beurteilt. Die Beladung des abgebildeten Westernblots war für alle Spuren gleichmäßig.

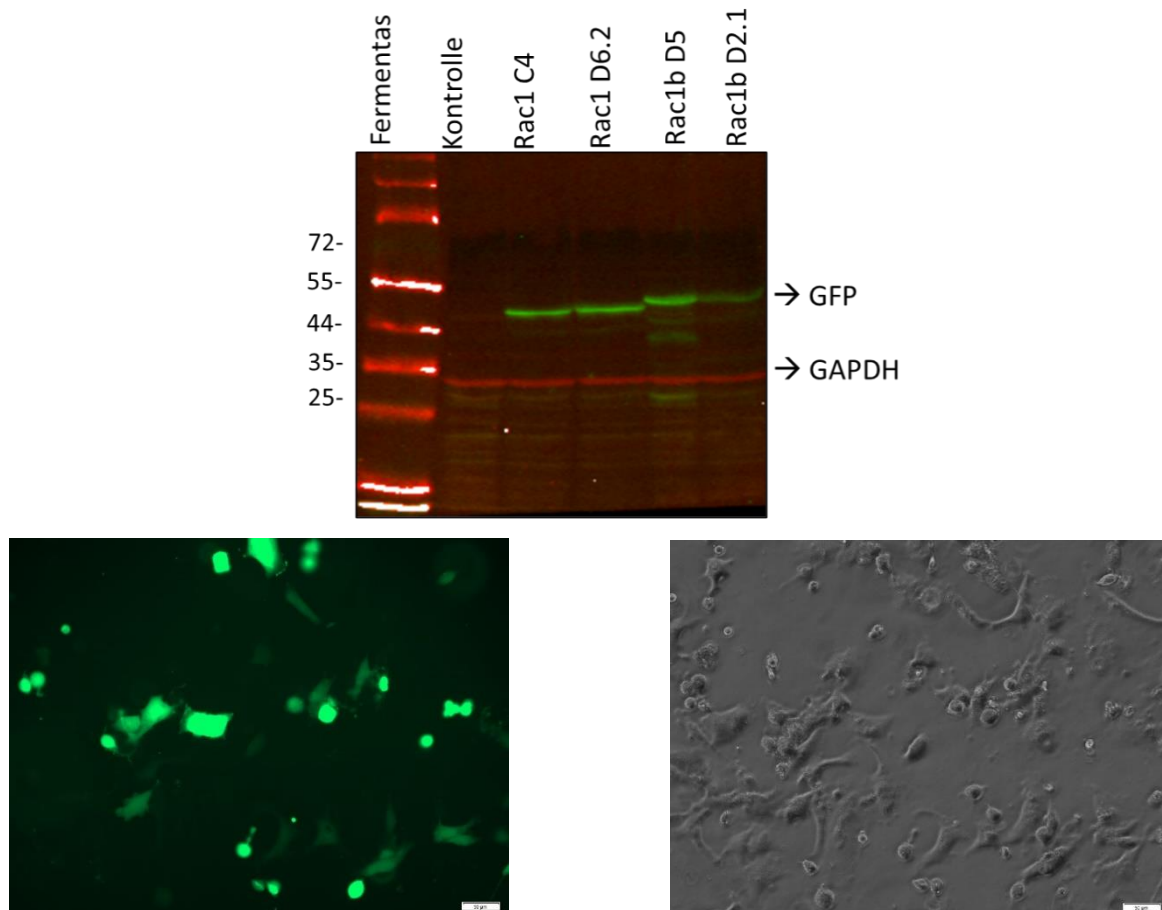


Abbildung 20: Immunfluoreszenz zur Beurteilung der Transfektionseffizienz der EGFP-Zellklone und Immunblot zum Nachweis der stabilen Transfektion mit pEGFP, pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b in HCC44-Zellen.

Jede Spur wurde mit 50µg Protein beladen. Der Nachweis von GAPDH belegt die gleichmäßige Beladung der Westernblotsuren. Der Gehalt an Fusionsprotein wurde mit Hilfe des fluoreszierenden EGFP-Anteils analysiert. Die höchste Intensität hatte die Bande für den EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellklon D5. Für den EGFP-exprimierenden Kontrollzellklon konnte in dem dargestellten Westernblot keine Bande detektiert werden. Dies steht im Widerspruch zu den Aufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Bild oben). In diesem erkennt man grün-fluoreszierende Zellen (links). Die Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop lassen auf die Zahl der transfizierten Zellen schließen. Zur Beurteilung der Transfektionseffizienz (siehe Material und Methoden) ist das Bild im Phasenkontrast (rechts) abgebildet. Die Transfektionseffizienz betrug für die EGFP-Kontrolle 50%.

3.6.1 Auswirkung der dauerhaften Überexpression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die Aktivität der Kinase AKT

Es erfolgte die Analyse der Westernblots hinsichtlich der Aktivitätsänderung der Kinase AKT in den verschiedenen Zellklonen. Als erstes wurden die EGFP-Rac1-exprimierenden Zellklone mit der Kontrolle verglichen. In allen drei durchgeführten Westernblots wurde keine Änderung der Phosphorylierung von AKT unter Überexpression von EGFP-Rac1 im Vergleich zu der Kontrolle festgestellt.

Der Vergleich der EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellklone mit der Kontrolle ergab in der Gesamtheit ebenfalls keinen Hinweis auf eine Phosphorylierungsänderung von AKT unter dauerhaftem Einfluss des überexprimierten Proteins EGFP-Rac1b (Abb.21).

Zusammengefasst hat weder eine dauerhafte Überexpression von EGFP-Rac1 noch von EGFP-Rac1b in HCC44-Zellen eine Auswirkung auf die Phosphorylierung von AKT.

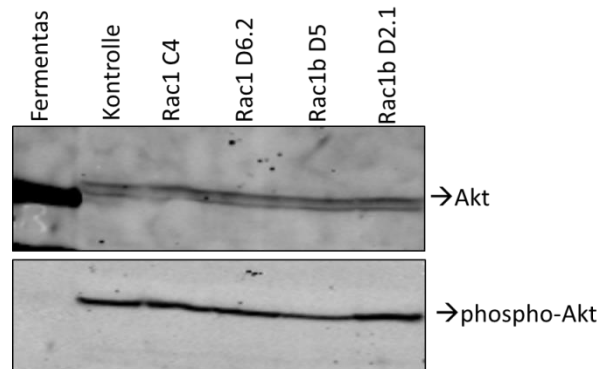


Abbildung 21: Westernblot zum Nachweis der Phosphorylierung der Kinase AKT in stabil-transfizierten HCC44-Zellen.

Es wurde die Phosphorylierung der Kinase AKT in Zellen untersucht, die die Proteine EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b dauerhaft exprimieren. Der dargestellte Westernblot zeigt eine verminderte AKT-Phosphorylierung für den Zellklon EGFP-Rac1b D5 an. Diese Beobachtung konnte in keinem weiteren der vier durchgeführten Versuche gemacht werden. Insgesamt wurde als Ergebnis der Versuchsreihe eine unveränderte Phosphorylierung von AKT in dauerhaft EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen der Zelllinie HCC44 festgestellt.

3.6.2 Auswirkung der dauerhaften Expression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die Kinase p38

In den Versuchen zur Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 in stabil transfizierten EGFP-Rac1-exprimierenden HCC44-Zellen wurde unter Berücksichtigung von Beladungsunterschieden, gemessen am Haushaltsprotein GAPDH, keine Änderung der Phosphorylierung im Vergleich zu der Kontrolle beobachtet (Abb.22).

In beiden Klonen D5 und D2.1, die stabil EGFP-Rac1b produzieren, wurde die p38-Aktivität induziert. Im Klon D5 konnte dieses Ergebnis in allen drei Versuchen nachvollzogen werden, für den Klon D2.1 nur in zwei von drei Versuchen. Die Aktivitätszunahme von p38 ist in dem Klon D5 deutlich ausgeprägter als in Klon D2.1. Jedoch zeigte der Klon D5 bereits in den Vorversuchen das stärkste Bandensignal beim GFP-Nachweis. In der densitometrischen Auswertung für den Zellklon D5 wurde ein Mittelwert von $MW=1,85$, ($SD\pm 0,96$) und für D2.1 $MW=1,14$ ($SD\pm 0,27$) ermittelt. Diese Werte weisen darauf hin, dass es unter dauerhafter Expression von EGFP-Rac1b in HCC44-Zellen zu einer Aktivitätszunahme von p38 kommt.

Zusammengefasst führte die dauerhafte Überexpression von EGFP-Rac1 zu keiner Phosphorylierungsänderung von p38. In HCC44-Zellen, die EGFP-Rac1b dauerhaft überexprimieren, ist eine Zunahme der p38-Phosphorylierung anzunehmen.

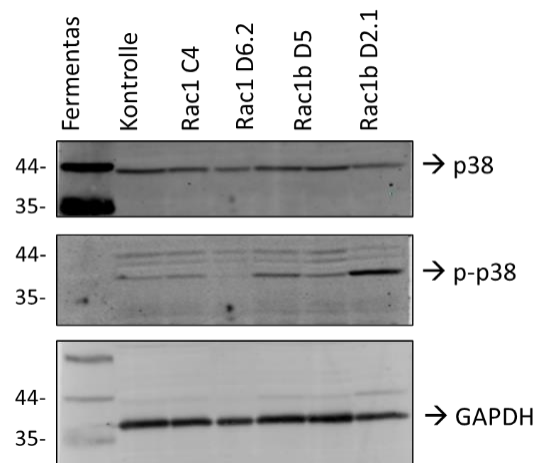


Abbildung 22: Westernblot zum Nachweis der Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 in stabil-transfizierten HCC44-Zellen.

Es wird die Phosphorylierung der Kinase p38 in Zellen untersucht, die die Proteine EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b dauerhaft exprimieren. Der dargestellte Westernblot zeigt eine verminderte Phosphorylierung für den Zellklon EGFP-Rac1 D6.2 an. Das liegt an der geringeren Beladung dieser Spur im Vergleich zur Kontrolle. Die Beladung wurde anhand des Haushaltsproteins GAPDH gemessen. Der Westernblot zeigt die Zunahme der Phosphorylierung der p38-Kinase in den EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellklonen D5 und D2.1. in HCC44-Zellen.

3.7 Auswirkung von EGFP-Rac1, EGFP-Rac1b und TGF β auf Paxillin, Vimentin und β -Aktin in HCC44-Zellen

In diesem Kapitel wurde erarbeitet, ob die Transfektion mit pEGFP-Rac1 oder pEGFP-Rac1b einen Einfluss auf die Proteinmenge folgender Proteine hat: Paxillin, Vimentin und β -Aktin. Diese Versuche wurde in transient transfizierten Zellen und in stabil etablierten Zellen der Zellreihe HCC44 durchgeführt. Bei den transient transfizierten, also denen, die die Fremd-DNA nur vorübergehend exprimierten, wurde auch der Einfluss von TGF β untersucht. Die einzelnen Zellproben wurden dabei immer in Bezug zu der Kontrolle (EGFP-exprimierende Zellen) gesetzt. Als Ladungskontrolle diente das Haushaltsprotein GAPDH. Als erstes wird der Effekt der transienten Transfektion mit pEGFP, pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b und der Effekt von TGF β auf die oben genannten Proteine behandelt.

3.7.1 Auswirkung der transienten Transfektion mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf Paxillin

Paxillin ist ein 68kDa schweres Protein, welches in Fokalkontakten lokalisiert ist. Durch seine Bindung an Adhäsionsproteine und Aktin koppelt es das Aktin-Zytoskelett der Zelle mechanisch an Rezeptoren der extrazellulären Matrix. Es trägt so zur Integrität der Zelle bei.

Zuerst wurde die Auswirkung der transienten Überexpression von EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b auf Paxillin untersucht. In den EGFP-Rac1-, aber auch EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen wurde im Vergleich zu der EGFP-Kontrolle keine Änderung der Bandenintensität und somit der Menge des Paxillins festgestellt (Abb. 23).

Im Anschluss wurde die Auswirkung der Stimulation mit TGF β auf die EGFP-exprimierenden Zellen betrachtet. Unter der TGF β -Stimulation kam es in den mit TGF β -stimulierten EGFP-exprimierenden Zellen verglichen zu der Kontrolle in zwei von drei Versuchen zu einer Abnahme der Bandenintensität. Die Beladung war gemessen am Haushaltsprotein GAPDH gleichmäßig (Abb. 23).

In den mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen wurde eine Abnahme der Paxillinmenge im Vergleich zu den nicht-stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen gesehen. Eine gleichzeitige TGF β -Behandlung und Überexpression von EGFP-Rac1 induzierte keine weitere Abnahme des Proteins in den Zellen (Abb. 23). In den EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen kam es nach der TGF β -Behandlung im Vergleich zu den nicht-stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen in allen Versuchen zu einer Abnahme der Paxillinmenge. Eine gleichzeitige TGF β -Stimulation und EGFP-Rac1b-Überexpression führten nicht zu einer weiteren Abnahme der Paxillinmenge. In der Gesamtheit nahm die Paxillinmenge in HCC44-Zellen unter der Behandlung mit TGF β sowohl in den EGFP-Rac1- als auch EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen ab.

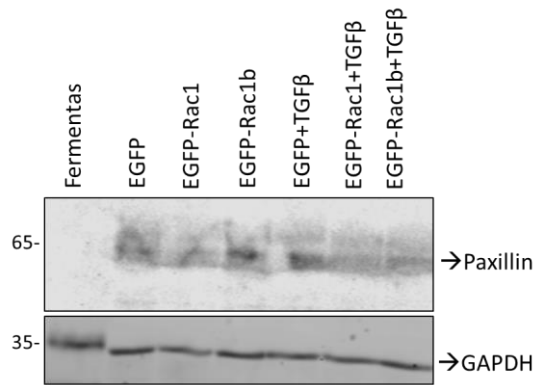


Abbildung 23: Westernblot zum Nachweis des Proteins Paxillin.

Jede Spur des Westernblots wurde mit 30µg Protein beladen. Als Ladungskontrolle diente das Haushaltsprotein GAPDH. Der dargestellte Westernblot zeigt unter Berücksichtigung der Beladung eine annähernd gleiche Paxillinmenge für EGFP-Rac1-exprimierende Zellen im Vergleich zur Kontrollbande (in EGFP-positiven Zellen). Die Überexpression von EGFP-Rac1/-Rac1b bewirkte keine Änderung der Paxillinmenge in den HCC44-Zellen. In den TGFβ-behandelten EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-Zellen ist im Vergleich zu EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b eine Abnahme der Paxillinmenge sichtbar.

3.7.2 Auswirkung der transienten Transfektion mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf Vimentin

Als nächstes erfolgte die Betrachtung des Intermediärfilaments Vimentin. Die Transfektion mit pEGFP-Rac1 bzw. pEGFP-Rac1b zeigte keine Auswirkung auf die Menge an Vimentin in HCC44-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 24).

Die TGFβ-Stimulation der EGFP-exprimierenden Zellen zeigte keine Auswirkung auf Vimentin im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle (Abb. 24). Eine TGFβ-Stimulation bewirkte in den EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den nicht stimulierten EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen und auch im Vergleich zu der TGFβ-stimulierten Kontrolle keine Änderung der Bandenintensität von Vimentin.

Die TGFβ-Behandlung der EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen führte im Vergleich zu den nicht stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen zu einer Zunahme von Vimentin in den HCC44 Zellen. Die transiente Überexpression von Rac1b und gleichzeitige TGFβ-Stimulation ergab im Vergleich zu der stimulierten EGFP-Kontrolle ebenfalls eine Zunahme des Proteins in den HCC44 Zellen (Abb. 24). TGFβ führte demnach zu einer Zunahme von Vimentin in Zellen, die EGFP-Rac1b transient überexprimierten. Eine alleinige Überexpression von Rac1b in den HCC44-Zellen hatte keine Auswirkungen auf Vimentin.

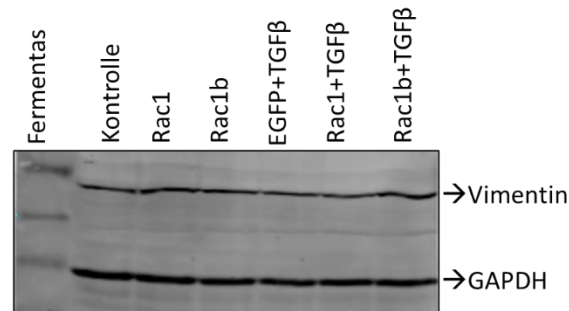


Abbildung 24: Westernblot zum Nachweis der Auswirkungen der transienten Transfektion mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf das Intermediärfilament Vimentin.

Die Versuchsreihe umfasst drei voneinander unabhängige Westernblotversuche. Als Kontrolle dienten EGFP-exprimierenden Zellen. Der dargestellte Westernblot zeigt den Nachweis der Proteine Vimentin und GAPDH. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Auffallend ist die dunklere Bande für die EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen nach TGFβ-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle. Diese Beobachtung konnte in allen drei Westernblots gemacht werden.

3.7.3 Auswirkung der transienten Transfektion mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf β -Aktin

β -Aktin ist eine von sechs der in Wirbeltieren vorkommenden Formen des Strukturproteins Aktin. Aktin ist unabdingbar bei wichtigen physiologischen Prozessen der Zelle wie zum Beispiel: Zellmigration, Muskelkontraktion, Signaltransduktion, Zelladhäsion und Beibehaltung der Zellform.

Die Transfektion mit pEGFP-Rac1 bzw. pEGFP-Rac1b führte im Vergleich zu der Kontrolle zu keiner Änderung der Menge an β -Aktin in HCC44-Zellen. Auch unter der Behandlung mit TGF β wurde keine Änderung der Bandenintensität von β -Aktin festgestellt. (Abb.25). Dies betrifft sowohl die EGFP-Rac1- als auch EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen.

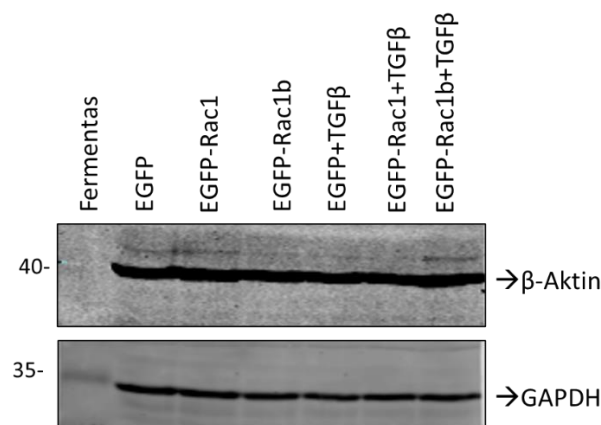


Abbildung 25: Westernblot zum Nachweis des Proteins β -Aktin in pEGFP-Rac1- und pEGFP-Rac1b-transfizierten HCC44 Zellen.

In jeder Spur wurden 30 μ g Protein aufgetragen. β -Aktin wurde in allen Westernblots bei 42kDa nachgewiesen. Eine gleichmäßige Beladung konnte anhand des Haushaltsprotein GAPDH nachgewiesen werden. Für das Protein β -Aktin konnte keine Änderung der Bandenintensität nach der Transfektion mit pEGFP-Rac oder pEGFP-Rac1b detektiert werden. Auch die Stimulation mit TGF β hatte keine Auswirkungen hinsichtlich einer Zu- oder Abnahme der Bandenintensität.

3.8 Auswirkungen der stabilen Transfektion mit pEGFP, pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf die Proteine Paxillin, Vimentin und β -Aktin

Anschließend wurde untersucht, ob eine dauerhafte Expression von EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b einen Effekt auf die Proteinmenge von Paxillin, Vimentin oder β -Aktin hat.

3.8.1 Auswirkungen der stabilen Transfektion von EGFP-Rac1/-Rac1b auf Paxillin

Im Folgenden werden die Auswirkungen der stabil transfizierten Proteine EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b auf das Protein Paxillin beschrieben. Die Beurteilung der Banden von Paxillin wurde dadurch erschwert, dass diese verbreitert und nicht als einheitliche Linie abgebildet werden konnten. Eine breitere Bande mit dunkleren Bandenanteilen im Vergleich zur Kontrolle wurde als Intensitätszunahme gewertet.

Unter Berücksichtigung von Ladungsunterschieden konnte für die stabil EGFP-Rac1- bzw. Rac1b-exprimierenden Zellen keine deutliche Änderung des Proteins Paxillin festgestellt werden. Auch in der ergänzenden Densitometrie konnte bei einem Mittelwert von 0,89 (EGFP-Rac1, SD $\pm 0,31$) bzw. MW=0,99 (EGFP-Rac1b, SD $\pm 0,43$) im Vergleich zum Signal der EGFP-Bande diese Beobachtung gemacht werden.

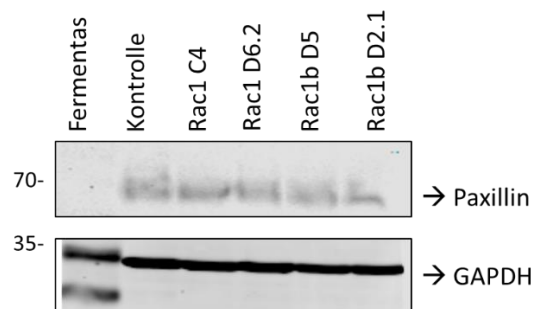


Abbildung 26: Westernblot zur Analyse der Auswirkung von stabil-exprimierten EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b auf Paxillin in HCC44-Zellen.

In jeder Spur wurden 50 μ g Protein aufgetragen. Als Beladungskontrolle diente das Haushaltsprotein GAPDH. Es wurden vier Versuche durchgeführt. Eine Zu- oder Abnahme des Proteins unter der stabilen Expression von EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b konnte nicht festgestellt werden.

3.8.2 Auswirkungen der stabilen Transfektion von HCC44-Zellen mit pEGFP-Rac1/-Rac1b auf Vimentin

Im nächsten Abschnitt wurde die Auswirkung der dauerhaften Expression der Proteine EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b in HCC44-Zellen auf das Intermediärskelettprotein Vimentin untersucht. Der repräsentativ dargestellte Westernblot zeigte bei gleichmäßiger Beladung gemessen anhand von GAPDH keine Änderung der Bandenintensität oder

Bandenbreite für das etwa 54 kDa schwere Protein Vimentin in den einzelnen Zellklonen (n=5) (Abb.27).

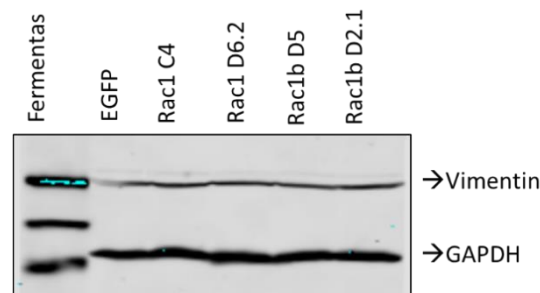


Abbildung 27: Immunblot zur Darstellung von Vimentin in stabil EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b-exprimierenden HCC44-Zellen.

In jeder Spur wurden 50 µg Protein aufgetragen. Die Beladung wurde anhand des Proteins GAPDH beurteilt. Es wurden fünf Versuche durchgeführt. In allen Versuchen konnte unter Berücksichtigung von Beladungsungleichmäßigkeiten gezeigt werden, dass die Menge an Vimentin trotz stabiler Expression von pEGFP-Rac1 oder pEGFP-Rac1b unverändert blieb.

3.8.3 Auswirkungen der stabilen Transfektion von EGFP-Rac1/-Rac1b auf β -Aktin

Sowohl in den stabil EGFP-Rac1- als auch EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen konnte keine eindeutige Änderung der β -Aktinmenge im Vergleich zu der Kontrolle detektiert werden (Abb.28). Die dauerhafte Überexpression von EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b hat demnach keine Auswirkung auf die Menge von β -Aktin in HCC44-Zellen.

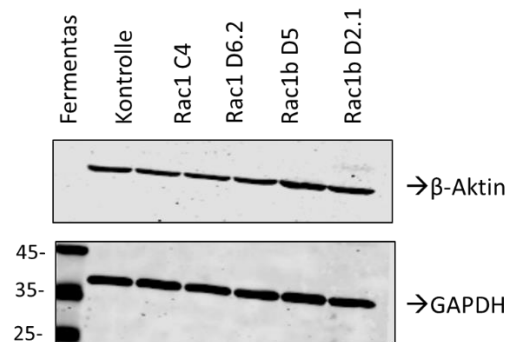


Abbildung 28: Immunblot zur Darstellung der Auswirkung auf β -Aktin in stabil transfizierten EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b-exprimierenden HCC44-Zellen.

Weder eine dauerhafte Überexpression von EGFP-Rac1 noch von EGFP-Rac1b führte zu einer Änderung der Menge von β -Aktin in den stabil etablierten Zellklonen. In allen Westernblotversuchen wurde eine gleichmäßige Beladung detektiert. Der abgebildete Westernblot stellt repräsentativ die Ergebnisse für die fünf Versuche dar.

4 Diskussion

Mittels dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Überexpression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b in Lungenkarzinomzellen eine Auswirkung auf die Aktivierung der Signalproteine des MAPK-sowie AKT-Signalweges hat (JNK, p38, ERK und AKT). In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss von TGF β auf die Rac1- bzw. Rac1b-abhängige Signaltransduktion mittels oben genannter Kinasen untersucht. Da Rac1 bekannterweise an der Migration der Zellen im Rahmen der Ausbildung von Lamellipodien beteiligt ist, wurde in dieser Arbeit geprüft, ob Rac1, aber vor allem auch die Splicevariante Rac1b, in überexprimierter Form die Menge der Proteine Vimentin, Paxillin und β -Aktin in Lungenkarzinomzellen beeinflusst.

4.1 Rac1 und Rac1b als mögliche *upstream*-Regulatoren von MAP-Kinasen und AKT

Es wurden transiente Transfektionsversuche mit pEGFP, pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b in den Lungenadenokarzinomzelllinien HCC44 und H23 unternommen, um mittels Westernblotverfahren und anschließender Antikörperfärbung eine Änderung der Phosphorylierung der Kinasen p38, JNK, ERK und AKT zu detektieren. So sollte eine mögliche Aktivierung dieser Kinasen durch die Überexpression von EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b erkannt werden. Ferner ging es um die Fragestellung, ob es Unterschiede zwischen einer vorübergehenden, also transienten und einer dauerhaften Expression von EGFP-Rac1/-Rac1b auf die Phosphorylierung der Kinasen gibt. Zur Klärung wurden stabile EGFP-, EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierende Zellklone etabliert.

4.1.1 Effekt von EGFP-Rac1/ -Rac1b auf JNK

In den transienten Transfektionsversuchen konnte in HCC44-Zellen nachgewiesen werden, dass eine transiente Überexpression von EGFP-Rac1 zu einer Zunahme der Phosphorylierung von JNK führt (Abb.6). Bereits 1995 fanden Minden et al. heraus, dass die Kinase JNK nicht wie die MAP-Kinase ERK über die GTPase Ras, sondern über Rho-GTPasen aktiviert wird. Zu diesen Rho-GTPasen gehören u.a. Rac1, Rac2 und Cdc42

(Minden et al. 1995, Coso et al. 1996). Westwick et al. konnten in NIH3T3-Kolonkarzinomzellen nachweisen, dass Rac1 JNK unabhängig von der p21-aktivierten Kinase (PAK) aktiviert (Westwick et al. 1997). In aktuellen Studien wurde gezeigt, dass Rac1 in Herzmuskelzellen (He9c2-Zelllinie) zu einer Aktivierung von JNK und dem Transkriptionsfaktor c-Jun mit nachfolgender Aktivierung von Cyclin D führt (Zhao et al. 2018). Singh et al. bezeichnen die Aktivierung von JNK und die Ausbildung von Lamellipodien sogar als wichtigstes Kennzeichen der Kinase Rac1 (Singh et al. 2004). Die Ergebnisse legen nahe, dass Rac1 in mehreren Zelltypen JNK aktiviert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die transiente Überexpression von EGFP-Rac1b ebenfalls mit einer Aktivierung von JNK in HCC44-Zellen einhergeht (Abb. 6). In aktuellen Arbeiten wurde gezeigt, dass eine stabile Überexpression von Rac1b in Nieren- und Kolonkarzinomzellen (HEK 293T und SW480) zu einer Zunahme der JNK2-Phosphorylierung führt. Die JNK2-Phosphorylierung führt weiter über die Aktivierung von c-jun und Cyclin D2 zu einer Zunahme der Zellproliferation (Li et al. 2016).

Ganz vergleichbar sind die Ergebnisse jedoch nicht, da Li et al. stabile Zellklone verwendeten und in der vorliegenden Arbeit nur die transiente Expression von EGFP-Rac1b als Auswirkung auf JNK betrachtet wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten aber darauf hin, dass Rac1b sowohl in einer transienten Transfektion als auch in stabil etablierten Zellklonen zu einer Aktivierung von JNK führt. Im Kontrast dazu stehen zuvor durchgeführte Versuche von Matos et al. und Singh et al., die darauf hinweisen, dass JNK in Fibroblastenzellen der Maus (NIH3T3-Zellen) kein *downstream*-Effektor von Rac1b ist. Sie legten auch dar, dass Rac1b im Gegenteil zu Rac1 nicht zu einer Induktion von Lamellipodien und der Aktivierung von PAK führt (Matos et al. 2003; Singh et al. 2004). Zu beachten ist allerdings, dass in den genannten Arbeiten mit Fibroblastenzellen gearbeitet wurde und nicht wie in dieser Arbeit mit Lungenadenokarzinomzellen. Es ist denkbar, dass JNK nur in bestimmten Karzinomzellen ein nachgeschalteter Effektor von Rac1b ist. Um das zu verifizieren, müssten sich weitere Untersuchungen in unterschiedlichen Epithelzelllinien anschließen.

4.1.2 Effekt von EGFP-Rac1/ -Rac1b auf p38

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen konnte keine Aktivierung der MAP-Kinase p38 durch eine transiente Überexpression von EGFP-Rac1 nachgewiesen werden (Abb.8). Dies betrifft sowohl die Zelllinie HCC44 als auch H23. In der Literatur ließen sich nur einige ältere Studien zu der Aktivierung von p38 durch Rac1 finden. Zhang

et al. wiesen in Koexpressionsversuchen eine deutliche Zunahme der p38-Aktivität in Fibroblasten der Zelllinie COS-1 nach. Verglichen wurde die Zunahme der p38 Aktivität mit der Aktivitätszunahme nach einer UV-Stimulation. UV-Licht gilt unter anderem als Stimulator der MAP-Kinase p38. Die Aktivierung von p38 scheint über die p21-aktivierte Kinase weiter geleitet zu werden (Zhang et al., 1995; Zarubin et al., 2005).

In weiteren Koexpressionsversuchen mit Rac1 und p38 konnte gezeigt werden, dass es zu einer weiteren Zunahme der p38-Aktivität bei gleichzeitiger Koexpression von Rac1, PAK und p38 kam (Zhang et al. 1995). Außerdem wurde nachgewiesen, dass Rac1 an die Mitogen-activated kinase kinase kinase 1 (MEKK1) und an Mixed Lineage Kinase 1 (MLK1) bindet und in der Folge über PAK die Kinase p38 aktiviert (Zarubin et al. 2005). Es kann anhand der vorhandenen Daten aus dieser Arbeit sowie der publizierten von Zhang et al. geschlossen werden, dass Rac1 zwar in Fibroblasten, aber nicht in Lungenadenokarzinomzellen zu einer Rac1-abhängigen p38-Aktivierung führt.

Als nächstes wurde untersucht, ob eine stabile Transfektion der Proteine EGFP-Rac1/-Rac1b im Vergleich zu der transienten Überexpression eine andere Auswirkung auf p38 haben könnte. Es konnte eine tendenzielle Zunahme der Aktivität der MAP-Kinase p38 in stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abb. 22). Es besteht demnach ein Unterschied darin, ob das Protein vorübergehend in der Zelle exprimiert wird oder ob es zur Integration des Proteins in das Genom kommt. Bisher gibt es in der Literatur keine Daten zu einer möglichen Aktivierung der Kinase p38 durch Rac1b. Auch gibt es keine Untersuchungen zu einem möglichen Unterschied zwischen einer transienten und einer stabilen Transfektion von Rac1b. Das in dieser Arbeit erzielte Ergebnis ist ein erster Hinweis auf einen aktivierenden Effekt von Rac1b auf die MAP-Kinase p38 in Lungenkarzinomzellen, der in einem Zellklon beobachtet werden konnte.

4.1.3 Effekt von EGFP-Rac1/ -Rac1b auf ERK

Eine Aktivierung der *extracellular-signal-related kinase* ERK als Ergebnis einer transienten Überexpression von Rac1 bzw. Rac1b konnte in Zellen der Zelllinie HCC44 nicht nachgewiesen werden (Abb. 7). Neben der Zelllinie HCC44 wurden auch Zellen der Lungenkarzinomzelllinie H23 nach einer transienten Transfektion mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b analysiert. Auch in den H23-Zellen konnte keine Änderung der Phosphorylierung der Kinase ERK detektiert werden (Abb. 15). Minden et al. 1995 und Coso et al. 1996 beobachteten, dass die Aktivierung der Kinase ERK nicht über Rho-GTPasen verläuft, sondern über Ras-GTPasen.

Aktuellere Studien zeigen, dass eine Rac1-abhängige ERK-Aktivierung möglich ist. Mittels Koimmunoprecipitationsversuchen konnte gezeigt werden, dass es in ERK-Mutanten, die nicht direkt MEK1 binden können, Rac1-abhängig zu einer ERK-MEK1 Assoziation kommt (Eblen et al. 2002). Eine Bindung zwischen MEK1 und ERK ist notwendig, damit es zu einer Phosphorylierung von ERK kommt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine transiente Transfektion mit Rac1 und MEK1 zu einer Aktivierung von ERK führen kann. Rac1 führt allerdings nicht zu einer direkten Aktivierung von ERK, sondern phosphoryliert PAK1-abhängig die prolinreichen Termini von MEK (Eblen et al. 2002). Dies erhöht die Bindung zwischen MEK1 und ERK, was in einer erhöhten ERK-Aktivität resultiert. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Rac1 PAK3-abhängig zur Phosphorylierung von Raf-1 beiträgt, wodurch auch eine Aktivierung von ERK resultiert. Die von Eblen et al. erzielten Ergebnisse stehen zwar in Kontrast zu den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen, jedoch muss bei der Betrachtung der Ergebnisse beachtet werden, dass die Resultate von Eblen et al. in renalen Fibroblasten (COS-7 Zellen) und nicht in epithelialen Lungenkarzinomzellen erzielt wurden (Eblen et al. 2002).

Eine weitere Arbeit, die sich mit dem programmierten Zelltod, der unter anderem ERK-vermittelt abläuft, beschäftigt, konnte zeigen, dass eine Inhibition von Rac1 zu einer Ras-unabhängigen Aktivierung von ERK führt. Über Kotransfektionsversuche (HA-ERK und dominant-negative Rac1-Mutanten) in embryonalen Mausfibroblasten wurde detektiert, dass ein Fehlen von Rac1 zu einer moderaten Aktivierung von ERK führt. Diese moderate Aktivierung konnte in weiteren Versuchen mit der Beteiligung am programmierten Zelltod in Verbindung gebracht werden (Zugasti et al. 2001). Diese Resultate zeigen, dass nicht nur eine Überexpression von Rac1 Einfluss auf die Tumorgenese hat, sondern auch die Inhibition von Rac1. Interessant wäre, ob eine Inhibition von Rac1 in HCC44- oder H23-Zellen zu ähnlichen Ergebnissen wie in embryonalen Mausfibroblasten führt.

Zhou et al. zeigten 2013 in einem Mausmodell, dass Rac1b alleine zwar keine Tumorinitiation bewirkt, dass aber Rac1b und K-Ras einen synergistischen Effekt auf das Tumorstadium haben. Dazu etablierten sie ein Mausmodell, in dem Rac1b kontrolliert aktiviert werden konnte. Dies erfolgte durch einen Rac1b-Promoter, der durch die intranasale Zufuhr eines Adenovirus aktiviert wurde. Die infizierten Tiere entwickelten daraufhin Adenome oder Adenokarzinome. Ebenso besaßen die Mäuse einen K-Ras-Promoter, der über den gleichen Mechanismus aktiviert wurde (Zhou et al. 2013). Bei den Mäusen, in denen beide Gene aktiviert waren, sah man in der Langzeitbetrachtung über 24

Monate, dass es durch die Applikation des Virus zu einer vermehrten Tumormasse und zu einem schnelleren Tumorwachstum kam als bei Mäusen, die nur aktiviertes K-Ras besaßen (Zhou et al. 2013).

4.1.4 Effekt von EGFP-Rac1/ -Rac1b auf AKT

Die Aktivierung der Kinase AKT erfolgt über externe Stimuli, die über eine Tyrosinrezeptorkinase in die Zelle getragen werden. Die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) phosphoryliert Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PtdIns-(4,5)-P₂) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PtdIns-(3,4,5)-P₃) und führt so zur Rekrutierung der *Phosphoinositide-dependent-kinase-1* (PDK1) und AKT in die Plasmamembran. Dort wird AKT über PDK1 und den mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) Komplex an den Thr308- und Ser473-Resten phosphoryliert und aktiviert. AKT führt unter anderem zu einer Aktivierung von Rac1 und Cdc42, die wiederum ROCK aktivieren. So kommt es zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts, welche wiederum Einfluss auf die Migration und Motilität der Zellen hat (Niba et al. 2013; Chin und Toker 2009).

Es gibt Untersuchungen zur Rac1-vermittelten Phosphorylierung von AKT. Gonzales et al. konnten zeigen, dass Sphingosine-1-Phosphat (S1P) in Endothelzellen von Gefäßen zu einer Aktivierung von Rac1 und Phosphorylierung von AKT führt. In Vergleichsversuchen mit dominant negativen Rac1- und konstitutiv aktiven Rac1-Mutanten konnte über ein Westernblotverfahren nur in den konstitutiv aktiven Rac1-Mutanten eine Phosphorylierung der AKT-Kinase ausgemacht werden. In Rac1-*knockdown*-Versuchen wurde eine verminderte S1P-vermittelte Phosphorylierung von AKT festgestellt (Gonzales et al. 2016). Gleichzeitig konnte in diesen Zellen ein vermindertes S1P-induziertes endotheliales Zellwachstum und Zellmigration nachgewiesen werden. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass es auch Rac1-vermittelt zu einer Phosphorylierung von AKT kommt. In Versuchen mit Fibroblasten der Zelllinie NIH3T3 und COS-1 konnte gezeigt werden, dass Rac1 und Cdc42 zur Phosphorylierung von AKT führen und AKT an der PDGEF-induzierten Zellmigration beteiligt ist (Higuchi et al. 2001). In weiteren Untersuchungen konnte herausgefunden werden, dass Rac1b am ehesten über eine Aktivierung des AKT/PI3K-Weges zu einer Zelltransformation führt (Singh et al. 2004). Die geschilderten Ergebnisse wurden bisher vor allem in Fibroblastenzellen erzielt. Das Augenmerk der vorliegenden Arbeit lag auf der Auswirkung einer transienten oder stabilen Transfektion von pEGFP-Rac bzw. pEGFP-Rac1b auf die Aktivierung von AKT in Lungenadenokarzinomzellen anhand der Zelllinien HCC44 und H23. In der transienten

Transfektion führte weder eine Überexpression mit EGFP-Rac1 noch mit EGFP-Rac1b zu einer Aktivierung von AKT in HCC44-oder H23-Zellen, somit wurde geschlussfolgert, dass Rac1 und Rac1b in Lungenkarzinomzellen keinen Einfluss auf die Kinase haben (Abb.13). In der etablierten stabil EGFP-Rac1-/Rac1b-eprimierenden HCC44-Zelllinie zeigte sich eine allgemein sehr starke Phosphorylierung von AKT (Abb.21). Jedoch lag kein Unterschied in der Phosphorylierung von AKT in den einzelnen Proben (EGFP-, EGFP-Rac1, EGFP-Rac1b) vor.

Insgesamt gibt es bisher wenige Arbeiten zu den Auswirkungen von Rac1 und Rac1b auf die Phosphorylierung von AKT, sodass eine Einordnung der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse schwierig bleibt. Anzunehmen ist, dass eine dauerhafte Rac1-, Rac1b-Überexpression abhängig von der Zelllinie zu einer Änderung der AKT-Phosphorylierung führt (Derynck und Zhang 2003). Anhand der in dieser Arbeit gewonnen Daten kann diese Annahme nicht unterstützt werden. Die Aktivität der AKT Kinase scheint in den stabil EGFP-Rac1-/Rac1b transfizierten Zellen hoch zu sein. Dies kann am ehesten ein indirekter Effekt sein, da auch die mit pEGFP-transfizierten Zellen eine hohe Aktivität aufweisen.

4.2 Einfluss von TGF β auf MAP-Kinasen und AKT in EGFP-Rac1-/Rac1b-überexprimierenden Zellen

TGF β spielt eine zentrale Rolle im Prozess der Epithelialen-Mesenchymalen-Transformation (EMT). Die TGF β -induzierte EMT hat wiederum Anteil an der Metastasierung und Invasivität von Tumoren (Miyazono et al. 2018; Akhurst et al. 1999; Bakin et al. 2000). TGF β wirkt vor allem im fortgeschrittenen Tumorstadium als Tumorpromoter, indem es zu einer erhöhten Genominstabilität und zu einer Zunahme der Zellmigration und Metastasierung der Tumoren führt (Melzer et al. 2017). TGF β leitet die Signale über zwei Wege fort. Es sind ein Smad-abhängiger und ein Smad-unabhängiger Signalweg bekannt (Derynck und Zhang 2003). An dem Smad-unabhängigen Signalweg sind u.a. die MAP-Kinasen ERK, p38 und JNK, Rho-GTPasen wie Rac1 und Cdc42 und AKT/PI3K beteiligt. Anhand dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Auswirkung eine Stimulation mit TGF β auf die o.g. MAP-Kinasen und AKT in Abhängigkeit erhöhter Mengen von Rac1 oder Rac1b hat.

4.2.1 Einfluss der TGF β -Stimulation auf JNK

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit TGF β in HCC44-Zellen sowohl in EGFP-Rac1- als auch in EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen zu einer Abnahme der Phosphorylierung der Kinase JNK führt (Abb. 10). Das bedeutet, dass TGF β einen inhibierenden Einfluss auf die Kinase JNK in Lungenkarzinomzellen hat, die durch eine Rac1- bzw. Rac1b-Expression aktiviert sind. In der Kontrolle (EGFP-exprimierende Zellen) konnte nach der TGF β -Stimulation keine Änderung der JNK-Kinase nachgewiesen werden. TGF β führt also nur in den EGFP-Rac1/-Rac1b-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den nicht mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1/-Rac1b-exprimierenden Zellen zu einer Inhibierung der Kinase (Abb. 10).

Kontrovers zu den in den Lungenkarzinomzellen erzielten Ergebnissen dieser Arbeit wurde 1997 von Frey et al. eine Aktivierung von JNK durch TGF β in Mammakarzinomzellen nachgewiesen (Frey et al. 1997). Von Musci et al. wurde in Fibroblasten (NIH3T3-Zellen) mittels Transfektionsversuchen und anschließender Immunpräzipitation dargelegt, dass TGF β keine Auswirkung auf JNK in NIH3T3 Zellen hat (Musci et al. 1996). Die Versuche von Afti et al. mit epithelialen Leberkarzinomzellen zeigten 1., dass TGF β eine Aktivierung der Kinase JNK hervorruft und 2., dass die Signaltransduktion von TGF β über die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 verläuft (Afti et al. 1997).

2002 stellten Meriane et al. anhand eines Muskelzellmodells fest, dass TGF β in diesen Zellen die MAP-Kinase JNK aktiviert und dass dieser Signalweg über die GTPasen Rac1 und Cdc42 verläuft (Meriane et al. 2002). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von Rac1/Rac1b zu einer Aktivierung von JNK führt, eine TGF β -Stimulation im Vergleich zu den vorgestellten Arbeiten allerdings eine inhibierende Wirkung auf diese Aktivierung hat. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse kann die in den Versuchen verwendete Zellart sein. Afti et al. untersuchten Hepatozyten und Meriane et al. nutzten Fibroblasten. Außerdem unterschied sich die Dauer der TGF β -Stimulation in den Versuchen. Meriane et al. stimulierten die Zellen über 12 h mit einer TGF β -Konzentration von 10 ng/ml. In dieser Arbeit wurden die Zellen nur 2h mit einer TGF β -Konzentration von 10 ng/ml stimuliert. Möglicherweise ist der TGF β -Effekt von der Dauer der Stimulation und der Konzentration, mit welcher die Zellen behandelt werden, abhängig. Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist anzunehmen, dass eine kurze (2h) Stimulation nicht zu einer Aktivierung von JNK in EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen führt, sondern zu einer Inhibierung der Kinase.

In den publizierten Arbeiten wurde nur die Rho-GTPase Rac1 untersucht und nicht wie in dieser Arbeit die alternative Splicingform Rac1b. Von Rac1b ist bekannt, dass diese die TGF β -induzierte EMT inhibiert (Ungefroren et al. 2019). Dies wurde in Rac1b-Knockdownversuchen in Pankreaskarzinomzellen untersucht. Jedoch wurden in den Versuchen nur die MAP-Kinasen p38 und ERK betrachtet (Ungefroren et al. 2019). Versuche zum Aktivitätsgrad von JNK in Rac1b-exprimierenden Zellen nach TGF β -Stimulation, gibt es bis auf die Ergebnisse dieser Arbeit bislang nicht. Anhand der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse und der Erkenntnisse von Ungefroren et al. lässt sich schließen, dass Rac1b in TGF β -stimulierten HCC44-Zellen ebenfalls zu einer Inhibierung von JNK führt (Abb. 10, Tbl. 8).

4.2.2 Einfluss der TGF β -Stimulation auf p38

Die TGF β -induzierte EMT kann neben dem Smad-abhängigen Signalweg auch über einen *Crosstalk* zum p38 MAP-Kinase Signalweg ablaufen. Daher wurde in der Arbeit die Auswirkung einer TGF β -Stimulation auf die MAP-Kinase untersucht und der Frage nachgegangen, ob eine Überexpression von EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b in Lungenkarzinomzellen eine Auswirkung auf die Aktivierung von p38 haben könnte. Sowohl in den HCC44- als auch in den H23-Zellen führte die 2-stündige TGF β -Stimulation zu keiner Änderung der p38-Phosphorylierung (Abb. 12 (HCC44), Abb.18 (H23)). Auch konnte weder eine Aktivierung noch Inhibierung von p38 im Rahmen möglicher additiver Effekte zwischen TGF β und Rac1 oder Racb1 verzeichnet werden (Abb.12, Abb. 18).

In TGF β -sensitiven NMuMG-Zellmodellen (Epithelzellen der Milchdrüse der Maus) konnte gezeigt werden, dass TGF β Smad-unabhängig die MAPK p38 phosphoryliert und somit aktiviert wird (Bakin et al. 2002, Yu et al. 2002). Die Aktivierung von p38 war nachgewiesenermaßen dosisabhängig. Bereits eine Stimulation über 4 Stunden mit 0,1 ng/ml TGF β reichte aus, um in Westernblotversuchen und spezifischen Antikörperfärbungen einen Anstieg der Phosphorylierung detektieren zu können. Außerdem wurde in dominant-negativen Rac1-Transfektionsversuchen festgestellt, dass eine p38-Phosphorylierung nach der TGF β -Stimulation ausbleibt. Auch für die Beeinflussung von p38 durch Rac1b gibt es aktuelle Ergebnisse. In Keratozyten (HaCaT-Zellen) und in Pankreaskarzinomzellen (PANC-1) konnte in Rac1b-negativen Zellen nach 12-stündiger Behandlung mit 5ng/ml TGF β eine erhöhte p38-Phosphorylierung detektiert werden (Witte et al. 2017). Rac1b führte in den Versuchen von Witte et al. nicht zu einer

Aktivierung von p38, vielmehr wurde eine vermehrte p38-Phosphorylierung in dominant-negativen Rac1b-Mutanten beobachtet, sodass Rac1b eine negative Kontrolle der p38-Phosphorylierung zugeschrieben wurde (Witte et al. 2017).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die publizierten Daten nicht auf die Zelllinien HCC44 und H23 zu übertragen sind. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Pankreaskarzinom-, Brustdrüsenzellen und Keratozyten eine andere Regulation von p38 aufweisen als Lungenadenokarzinomzellen.

4.2.3 Einfluss der TGFβ-Stimulation auf AKT und ERK

Bekannt ist, dass die TGFβ-induzierte Aktivierung der MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 an verschiedenen Aktionen der Zellen involviert ist. Darunter fallen u.a. die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, die Regulation der Zellmigration und die epitheliale-mesenchymale Transformation (Zhang et al. 2005). In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob TGFβ auch einen Einfluss auf die Aktivität der Kinase AKT in Lungenkarzinomzellen hat und ob dieser mögliche Einfluss von einer Überexpression von EGFP-Rac1/-Rac1b abhängt.

Lamouille et al. dokumentierten, dass TGFβ über eine Aktivierung des mTOR-Komplexes S6K1 phosphoryliert. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass diese mTOR-Aktivierung aus einer Phosphorylierung von AKT/PI3K resultiert (Lamouille und Derynck, 2007). Demnach kann TGFβ eine Aktivierung des AKT/PI3K Signalweges mit einer anschließenden mTOR Aktivierung induzieren.

In H23-Zellen konnte in dieser Arbeit nach einer 2-stündigen TGFβ-Stimulation keine Zunahme der AKT-Phosphorylierung detektiert werden (Abb. 19). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den oben aufgeführten Resultaten anderer Arbeitsgruppen. Zu bedenken ist jedoch, dass die Ergebnisse zur Aktivierung von AKT durch TGFβ-Stimulation bisher noch nicht in Lungenkarzinomzellen erlangt wurden, sondern sich auf Milchdrüsenzellen, Keratinozyten und Prostatakarzinomzellen beziehen. Möglicherweise ist eine Übertragung der Ergebnisse von Lamouille et al. auf Lungenkarzinomzellen nicht möglich und TGFβ hat in diesen Zellen keinen nennenswerten Effekt auf die AKT Kinase. Auch bei der Untersuchung der MAP-Kinase ERK führte die Behandlung mit TGFβ weder in der HCC44-Zelllinie noch in der H23-Zelllinie zu einer nennenswerten Änderung der Phosphorylierung (Abb.11, Abb. 17). 1995 wurde von Hartsough und Mulder gezeigt, dass eine Stimulation mit TGFβ in intestinalen Epithelzellen zu einer Aktivierung von ERK führt (Hartsough und Mulder 1995). 2017 wiesen Principe et al. in humanen

Pankreaskarzinomzellen (PANC-1) eine Aktivierung von ERK nach der Stimulation mit TGF β nach (Principe et al. 2017).

Von Witte et al. konnte in Bezug auf die Rac1b-abhängige ERK-Aktivierung nach TGF β -Stimulation ebenfalls in Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden, dass dominant-negative Rac1b Mutanten nach einer TGF β -Stimulation eine starke Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK aufweisen. Im Gegensatz dazu führte eine ektopische Rac1b-Überexpression zu einer verminderten Phosphorylierung von ERK. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Rac1b in Pankreasepithelzellen die TGF β -abhängige Aktivierung von ERK in negativer Weise beeinflusst.

4.3 Überexpression von EGFP-Rac1/-Rac1 und TGF β -Stimulation als Einflussfaktoren auf die Proteinmenge von Paxillin, Vimentin, β -Aktin

Neben dem Einfluss von Rac1/Rac1b auf die Signaltransduktion war der Einfluss von Rac1, Rac1b und TGF β auf die Proteinkonzentration von Paxillin, Vimentin und β -Aktin in Zellen der Zelllinie HCC44 von Interesse. Des Weiteren wurde die Auswirkung einer stabilen Transfektion von Rac1/Rac1b im Vergleich zu einer transienten Transfektion auf die Menge der o.g. Proteine untersucht. Ferner ging es um die Frage, ob eine Stimulation mit TGF β , als bekannter Initiator der EMT, eine Auswirkung auf die oben genannten Proteine haben könnte und ob es Unterschiede zwischen den EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen nach einer TGF β -Stimulation gibt.

4.3.1 Änderung der Vimentinmenge unter Einfluss von Rac1/-Rac1b und TGF β

Vimentin ist ein Intermediärfilament vor allem mesenchymaler Zellen. Seine Expression in den Zellen korreliert mit der Aggressivität und Invasivität der Tumoren, mit einem geringeren Überleben der Patienten und mit einer schlechteren Prognose bei Patienten mit einem NSCLC (Havel et al. 2015; Zhang et al. 2009). Die Metastasierung eines Tumors wird vor allem durch eine Transition der epithelialen in mesenchymale Zellen begleitet. Die EMT ist durch folgende Veränderungen gekennzeichnet: Änderung der Zellmorphologie von epithelialen Zellen zu mesenchymalen Zellen, Reorganisation des Zytoskeletts, Verlust von Zell-Zell-Kontakten, Zunahme der Adhäsion zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix und dem Verlust der Zellpolarität (Havel et al. 2000, Meriane et al. 2000; Kidd et al. 2014; Lamouille et al. 2014). Vimentin ist ein bekannter,

mesenchymaler Biomarker der EMT (Thiery 2002). Neben F-Aktin ist es essentiell für die epithelial-mesenchymale Transition. Es reguliert Signalwege, ist zuständig für die Positionierung und Verankerung von Zellorganellen und die Zell-Zell- beziehungsweise Zell-Matrix-Verknüpfungen (Kidd et al. 2014).

Vimentin wird vor allem in aggressiven Tumoren und invasiven Zelllinien stark exprimiert (Havel et al. 2000). In REF-52-Zellen und humanen Fibroblasten (HS 68) wurde gezeigt, dass eine Überexpression von Rac1 bzw. eine konstitutive Aktivierung von Rac1 zu einer Relokalisierung von Vimentin führt. Normalerweise ist Vimentin vom Nucleus ausgehend radiär bis in die Zellperipherie reichend angeordnet. Durch eine Überexpression von Rac1 kommt es zu einem „Vimentinkollaps“. Dieser besteht darin, dass sich die Intermediärfilamente vornehmlich perinukleär anordnen (Meriane et al. 2000).

In einer aktuellen Arbeit von Seiz und Kollegen wurde nachgewiesen, dass in stabil EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellklonen ein höherer Anteil an den mesenchymalen Markern Vimentin und Cadherin 11 vorhanden ist als in EGFP-Kontrollklonen (Seiz et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit mit stabil EGFP-Rac1-exprimierenden HCC44 Zellklonen konnte kein Einfluss der Überexpression von EGFP-Rac1 auf die Vimentinmenge festgestellt werden. Bereits in den vorhergegangenen Versuchen hatte es sich abgezeichnet, dass es Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien gibt im Hinblick auf den Einfluss der Überexpression von EGFP-Rac1/-Rac1b und die Stimulation mit TGF β . Auch die Überexpression der alternativen Spliceform Rac1b führte nicht zu einer Änderung der Vimentinmenge.

Für Rac1b ist bekannt, dass es zigarettenrauchabhängig durch die Matrixmetalloproteasen (MMP-3 und MMP-9) aktiviert werden kann und in der Folge zu einer Zunahme von Vimentin in der Lungenkarzinomzelllinie H661 führt. In alveolären Epithelzellen von Mäusen konnte so eine MMP3-Rac1b-abhängige Induktion der EMT nachgewiesen werden (Stallings-Mann et al. 2013). Die Ergebnisse von Stallings-Mann et al. stehen in gewisser Diskrepanz zu den in dieser Arbeit erlangten Ergebnissen, da weder in den transient noch in den stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen eine Veränderung der Vimentinmenge detektiert wurde. Zu beachten ist bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse, dass die Versuche der vorliegenden Arbeit unabhängig vom Faktor Zigarettenrauch durchgeführt wurden. Bei Stallings-Mann et al. wurden Lungenzellen von aktiven Zigarettenrauchern verwendet. Es wurde allerdings nicht näher beschrieben, wie lange die Probanden bereits geraucht haben und wie hoch der tägliche Zigarettenkonsum war. In weiteren Arbeiten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden,

dass Rac1b als eigenständiger Faktor zu einer Tumorinitiation oder EMT führt (Zhou et al. 2013, Seiz et al. 2019, Zinn et al. 2019). Vielmehr konnte eine Korrelation zwischen einer hohen Rac1b-Expression und einem längeren Überleben der Patienten nachgewiesen werden (Ungefroren et al. 2014).

Weitere Publikationen deuten darauf hin, dass Rac1b als eigenständiger Faktor nicht an der Initiation der EMT beteiligt ist (Zhou et al. 2013). Es konnte aber eine Korrelation zwischen Rac1b und einer hohen Rate an K-Ras Mutationen mit einer verstärkten Zellproliferation und schnellerem Tumorstadium aufgezeigt werden (Zhou et al. 2013). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass Rac1b als eigenständiger Faktor zwar keine Tumorinitiation auslöst, jedoch durch Faktoren wie MMPs und K-Ras die Tumorinitiation verstärkt.

Auf dem Boden dieser Erkenntnisse erfolgte in den transient mit pEGFP-Rac1b transfizierten Zellen eine TGF β Behandlung. Die Stimulation mit TGF β führte in den EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen im Vergleich zu der stimulierten EGFP-Kontrolle und im Vergleich zu den nicht mit TGF β -stimulierten EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen zu einer Zunahme der Vimentinmenge in den HCC44-Zellen. Diese Beobachtung gibt einen Hinweis darauf, dass die Kombination einer Stimulation mit TGF β und einer Rac1b-Überexpression zu einer Zunahme des mesenchymalen Markers der EMT Vimentin führen.

4.3.2 Änderung der Paxillinmenge unter Einfluss von Rac1/-Rac1b und TGF β

Paxillin ist eine der wichtigsten Komponenten fokaler Adhäsionskontakte. Es dient zur Weiterleitung extrazellulärer Signale in den Intrazellularraum. Paxillin trägt aufgrund seiner Funktion als Gerüstprotein zur Bereitstellung von Kinasen, Phosphatasen, Kofaktoren und Strukturproteinen, die an zahlreichen Signalkaskaden beteiligt sind, bei. Paxillin spielt dadurch eine wichtige Rolle in der Zellmigration, wie beispielweise während der Wundheilung, Immunantwort und Angiogenese (López-Colomé et al. 2017).

Eine Überexpression von Paxillin in Glioblastomen geht mit einer verminderten Überlebenszeit der Patienten einher (López-Colomé et al. 2017). Außerdem wurde gezeigt, dass *Gain of function*-Mutationen, vor allen in Lungentumoren zu einer Tumorprogression, zu Tumorstadium und Zunahme der Invasivität führen (Jagadeeswaran et al. 2008). Paxillin bindet unter anderem die *focal adhesion kinase* (FAK) und die Tyrosinkinase Src. Diese phosphorylieren Rac1, was durch die Bildung von Lamellipodien zur Ausbreitung von Epithelzellen beiträgt (Chang et al. 2011). Von Deakin et al. wurde gezeigt, dass Rac1

in fokalen Komplexen lokalisiert ist. Hier fördert es die Interaktion zwischen Paxillin und Vinculin, wodurch robuste, „heranreifende“ Adhäsionskontakte entstehen (Deakin et al. 2012). Rac1 fördert demnach die Zellmigration durch Bildung von Lamellipodien und fokaler Komplexe.

In FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von Rac1 zu einer robusten Paxillin-Vinculin Adhäsion in fokalen Kontakten führt. Paxillin kann den PKL-PIX-PAK- Komplex rekrutieren und so die Umwandlung von Rho-vermittelten zu Rac1-vermittelten fokalen Kontakten herbeiführen, wodurch die Bildung von Lamellipodien und somit die Migration erleichtert wird (Chen et al. 2005). Außerdem kann es den Crk-DOCK180-Komplex an die Zellmembran rekrutieren und so eine Rac1-Aktivierung auslösen.

Es gibt bisher wenige Publikationen dazu, inwieweit Rac1 oder Rac1b Einfluss auf die Proteinmenge von Paxillin in Zellen nehmen kann. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob es zu Änderungen der Paxillinmenge in HCC44-Zellen nach einer transienten oder stabilen Transfektion von pEGFP-Rac1/-Rac1b oder einer Behandlung der transfizierten Zellen mit TGFβ kommt. Weder eine transiente noch stabile Transfektion von pEGFP-Rac1 oder pEGFP-Rac1b führte zu einer eindeutigen Änderung der Paxillinmenge in den Zellen (Abb. 23, Abb.26). Auffällig war jedoch, dass eine Stimulation mit TGFβ erstens in der EGFP-Kontrolle zu einer Abnahme der Paxillinmenge im Vergleich zur Kontrolle führte und zweitens auch in den EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen zu einer Abnahme der Paxillinmenge führte (Abb. 23). Interessant war, dass eine Stimulation mit TGFβ in allen untersuchten Zellen (EGFP-, EGFP-Rac1-, EGFP-Rac1b-exprimierende Zellen) eine Abnahme der Paxillinmenge im Gegensatz zu den nicht stimulierten Vergleichsproben bewirkt. Das legt nahe, dass der Effekt der Abnahme der Paxillinmenge in den Zellen TGFβ-vermittelt auftritt. Die Aussagekraft der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse wird durch die Qualität der Westernblots eingeschränkt, sodass die Ergebnisse nur als Hinweise gewertet werden.

In der Arbeit von Walsh et al. ergab die Stimulation mit TGFβ in malignomverdächtigen Epithelzellen aus dem Mundrachenraum der Maus eine deutliche Zunahme der Paxillinproteinmenge. Gleichzeitig wurde unter der Behandlung von TGFβ eine Abnahme der Phosphorylierung von Paxillin beobachtet (Walsh et al. 2011). Ähnliche Ergebnisse ergaben Untersuchungen in menschlichen Astrozytenzellen. Hier wurde ebenfalls eine Zunahme von Paxillin durch eine Behandlung mit TGFβ detektiert (Han et al. 2001). Die vorgestellten Ergebnisse wurden nicht in Lungenkarzinomzellen des

Menschen gewonnen, sondern in oralen Epithelzellen der Maus und zerebralen Astrozytenzellen des Menschen. Die Phosphorylierung von Paxillin wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, wobei dies auch ein interessanter Aspekt wäre, ob Rac1, Rac1b und TGF β einen Einfluss auf die Phosphorylierung in Lungenkarzinomzellen haben.

4.3.3 Änderung der β -Aktinmenge unter Einfluss von Rac1/-Rac1b und TGF β

β -Aktin ist eine der sechs Aktinisoformen. Aktin spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen physiologischen Prozessen. Für β -Aktin ist bekannt, dass es u.a am Aufbau von Filopodien und Lamellipodien beteiligt ist. Diese Strukturen sind wichtig bei der Lokomotion der Zellen (Simiczyjew et al. 2017; Peckham et al. 2001; Chen et al. 2005; Price und Collard 2001). Eine Rac1-Aktivierung löst die Bildung von aktinreichen Lamellipodien und Integrin-beinhaltenenden Adhäsionskomplexen, die eine Haftung an der extrazellulären Matrix vermitteln, aus (Price und Collard 2001). Eine Überexpression von Rac1 in Tumoren wie dem NSCLC, Magen-, Brust-, Hoden- oder Mundbodenkrebs führt zu einer erhöhten Migration und Metastasierung der Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von Rac1 im NSCLC eine Abnahme der Migration und Invasion nach sich zog (Chen et al. 2011). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen bewirkte weder eine transiente noch stabile Überexpression von Rac1 oder Rac1b eine Mengenänderung von β -Aktin (Abb. 25, Abb. 28). Es ist also anzunehmen, dass Rac1 und Rac1b zwar die Aktinpolymerisation beeinflussen, aber keinen Einfluss auf die Synthese von β -Aktin in HCC44-Zellen haben.

4.4 Rac1: Ein neuer Therapieansatz?

Wie bereits erwähnt, liegt Rac1 in vielen Krebsarten überexprimiert vor. Darunter fallen das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, gastrointestinale Karzinome, Hoden-, Brust und orale Plattenepithelkarzinome (Kamai et al. 2004, Fritz et al. 2002, Engers et al. 2007, Chen et al. 2011,). Die Rac1-Überexpression geht mit einer schlechteren Prognose für die Patienten einher. Für das NSCLC konnte in einer Studie von Chen et al. 2011 nach der Kaplan-Meier-Analyse für Patienten, die keine Rac1-Überexpression aufwiesen, eine 5-Jahresüberlebensrate von 32% prognostiziert werden. Das liegt deutlich über dem 5 Jahresüberleben von Patienten mit einer Rac1-Überexpression (Chen et al. 2011). Rac1 ist durch die Aktivierung der PAK vornehmlich in den Schlüsselfunktionen der Zellmetastasierung beteiligt. Das Zusammenspiel von Rac1 und PAK führt in den Zellen

zur Ausbildung von Lamellipodien, vermehrter Bildung fokaler Adhäsionskontakte und einer erhöhten Zellinvasivität und -motilität (Chen et al. 2011). Immer häufiger wird versucht, nur einzelne mutierte oder überexprimierte Proteine zu hemmen, um so eine auf den Tumor und den Patienten zugeschnittene Therapie gewährleisten zu können.

Die Rac1-Inhibition kann die Migration der Zellen minimieren (Chen et al. 2011). In aggressiven Brustkrebszellen wurde allerdings ein gegenteiliger Effekt der Inhibition von Rac1 beobachtet. Hier bewirkte die Inhibition eine Zunahme der Zellmigration (Zhou et al. 2006). Hieran wird deutlich, dass sich Rac1 unterschiedlich in verschiedenen Geweben verhält und eine zu schnelle Verallgemeinerung der Wirkprinzipien vermieden werden sollte. Die Behandlung von stark metastasierenden Lungenkarzinomzellen (801D-Zellen) mit dem Rac1-GEF-Inhibitor NSC23766 zeigte eine deutliche Abnahme der Migrationsfähigkeit der Zellen. Auch die Transfektion von *small hairpin*-RNA (Rac1-sh RNA) führte zu einer Reduktion der Migration und Invasivität. Es ist jedoch zu beachten, dass es ohne Rac1 keinen Aufbau des Aktinzytoskeletts in den Zellen gibt. Die Inhibition eines so zentralen Proteins scheint *in vivo* demnach keine gezielte Option zur Tumorthherapie zu sein.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Teile. Zum einen ist das Ziel der Arbeit den Effekt einer Überexpression von Rac1 und Rac1b in humanen Lungenadenokarzinomzellen (H23 und HCC44) auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen JNK, p38, ERK und der Kinase AKT zu untersuchen. Zum anderen ist die Auswirkung einer TGF β -Stimulation auf die Phosphorylierung der oben genannten Kinasen in Zellen, die entweder EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b überexprimierten, von Interesse. Der letzte Teil der Arbeit befasst sich mit dem Einfluss der Überexpression von Rac1 bzw. Rac1b auf die jeweilige Menge der Proteine Paxillin, Vimentin und β -Aktin in den Zellen der Zelllinien HCC44.

Um die Auswirkung der Überexpression von Rac1 und Rac1b auf die o.g. Kinasen zu untersuchen, wurden H23- und HCC44-Zellen mit pEGFP-Rac1 bzw. -Rac1b Plasmiden sowohl transient als auch stabil transfiziert. Um den Effekt einer TGF β -Stimulation zu prüfen, wurden in einer weiteren Versuchsanordnung die Zellen über 2 Stunden mit TGF β (10ng/ml) stimuliert. In beiden Versuchsanordnungen wurden mittels Westernblotverfahrens, anschließender Antikörperfärbung und densitometrischer Auswertung die Phosphorylierungsmuster der Kinasen JNK, p38, ERK und AKT analysiert. Die Auswirkung der Überexpression von EGFP-Rac1/-Rac1b auf die Proteine Paxillin, Vimentin und β -Aktin wurde durch die Immunblot-Methode bestimmt.

Eine Überexpression von EGFP-Rac1/-Rac1b führte zu einer Aktivierung der JNK-Kinase in HCC44-Zellen. Eine TGF β -Stimulation bewirkte allerdings eine diskret verminderte Phosphorylierung der JNK-Kinase sowohl in den EGFP-Rac1- als auch in den EGFP-Rac1b-exprimierenden HCC44-Zellen.

Aus der stabilen Überexpression der Plasmide pEGFP-Rac1/-Rac1b resultierte nur eine tendenzielle Zunahme der Phosphorylierung der p38 Kinase. Auf alle weiteren untersuchten Kinasen hatte eine stabile Transfektion der o.g. Plasmide keine nennenswerten Auswirkungen. Auf die untersuchten Zytoskelettproteine hatte besonders die Stimulation mit TGF β einen Effekt. Diese führte in den transient EGFP-Rac1b exprimierenden Zellen zu einer Vimentinzunahme und zu einer Abnahme von Paxillin in EGFP-Rac1/-Rac1b-exprimierenden Zellen.

Die Daten zeigen, dass Rac1 und Rac1b im NSCLC vor allem eine Auswirkung auf den Aktivitätszustand der Kinase JNK haben, aber sonst zu geringen Aktivierungsunterschieden der Kinasen p38, ERK und AKT führen.

6 Abstract

The present thesis is divided into three parts. The first part of the study proved the question, whether the overexpression of Rac1 and Rac1b in human lung adenocarcinoma cells (H23, HCC44) has an effect on the phosphorylation of the MAP-kinases JNK, p38, ERK and the kinase AKT. In the second part the impact of a TGF β -stimulation on the forementioned kinases was of interest. The last part focused on the influence of an overexpression of Rac1/Rac1b on the amount of paxillin, vimentin and β -actin in the cell lines H23 and HCC44.

To examine the effect of an overexpression of Rac1 and Rac1b on the kinases, the H23 and HCC44 cells were transiently or stable transfected with pEGFP-Rac1 or pEGFP-Rac1b plasmids. To analyze the impact of a TGF β -stimulation, the cells have been treated for two hours with TGF β . In both experimental setups the phosphorylation of the kinases JNK, p38, ERK and AKT was analysed by using western blot, antibody staining and densitometric evaluation. The effect of a Rac1-/Rac1b-overexpression on cytoskeletal proteins was measured with immunoblotting of the examined samples.

The tests have shown that the overexpression of EGFP-Rac1-/Rac1b leads to an activation of JNK in HCC44 cells. The TGF β -stimulation caused a decrease in phosphorylation of the JNK-kinase in EGFP-Rac- and EGFP-Rac1b-expressing HCC44-cells. The stable overexpression of EGFP-Rac-/Rac1b only showed a slight increase in phosphorylation of the p38 kinase. A stable or transient transfection has not shown any significant impact on any other kinase analyzed. However, the TGF β -stimulation had an effect on the cytoskeletal proteins. The stimulation led to an increased amount of vimentin in the transiently EGFP-Rac1-expressing cells and to a decrease of paxillin in EGFP-Rac1- and EGFP-Rac1b-expressing cells.

The data show that Rac1 and Rac1b mainly have an effect on the activity of JNK-kinase, but do not have any relevant impact on p38, ERK and AKT.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Arp2/3	Aktin-ähnliches Protein 2/3
BCA	Bicinchoninic acid
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CDK	<i>cyclin dependend kinase</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
Cu	Kupfer
dH ₂ O	<i>distilled water</i>
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCK 180	Dedicator of cytokinesis
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N, N, N', N'</i> -tetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK	<i>Extracellular signal-related kinase</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	fötales Kälberserum
FOXO	<i>Forkhead box protein</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase

GDI	GDP dissociation inhibitory factor
GEF	Guanosine triphosphate Exchange Factor
GFP	enhanced green fluorescent protein
GDP	Guanosin-5-diphosphat
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HCL-Puffer	Salzsäure Puffer
IGF	Insulin-Growth-Factor
IL-1	Interleukin 1
IRS p53	Insulin Rezeptor Substrat
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MAP-Kinase	mitogen-activated protein Kinase
MEK1	Mitogen-activated kinase kinase 1
MEKK1	Mitogen-activated kinase kinase kinase 1
MLK1	Mixed Lineage Kinase 1
MMP	Matrix-Metalloprotease
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>non-small lung cancer</i>)
NFκB	nuclear factor „ <i>kappa</i> -light-chain-enhancer“ of activated B-cells
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PI-3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP 5 Kinase	Phosphatidylinositol 4-Phosphat- 5-Kinase
PtdIns (4,5) P ₂	Phosphatidylinositol 4,5- biphosphat
Ras	Rat sarcoma
Raf	rat fibrosarcoma
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RACK	Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1

RB	Retinoblastom
Rho	Ras homolog
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase 1
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>small-cell lung cancer</i>)
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
S1P	Sphingosine-1-Phosphat
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamid
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS-Puffer	Tris(hydroxymethyl)aminomethan- Puffer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WAVE-Protein	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TGF β Signalwege adaptiert nach Derynck, R.; Muthusamy, B. P.; Saetern, K. Y., 2014	6
Abbildung 2: Effekte von Rac1	9
Abbildung 3: MAP-Kinasen-Signalwege	13
Abbildung 4a-f: Transfektionsversuch mit den Zelllinien H23 und HCC44	35
Abbildung 5 : Immunblot zum Nachweis der Expression von EGFP, EGFP-Rac1/-Rac1b in H23- und HCC44-Zellen.	36
Abbildung 6: Nachweis der Phosphorylierung der Kinase JNK in HCC44-Zellen und die densitometrische Auswertung.	38
Abbildung 7: Immunblot zum Nachweis der Phosphorylierung der ERK-Kinase; densitometrischer Nachweis der ERK2-Phosphorylierung.	39
Abbildung 8: Immunblot zum Nachweis der Phosphorylierung der p38-Kinase und densitometrische Auswertung.	40
Abbildung 9: Immunblot zum Nachweis der Phosphorylierung der AKT-Kinase und densitometrische Auswertung.	41
Abbildung 10: Nachweis der Phosphorylierung der Kinase JNK in HCC44-Zellen und die densitometrische Auswertung.	44
Abbildung 11: Westernblot zur Darstellung der Auswirkung der TGF β -Stimulation auf die Kinase ERK 2, densitometrische Auswertung der Bandenfärbung.	46
Abbildung 12: Westernblot zur Darstellung der Auswirkung der TGF β -Stimulation auf die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38.	49
Abbildung 13: Immunblot zum Nachweis der Auswirkung von TGF β auf die Rac1- und Rac1b-abhängige Aktivierung von AKT.	52
Abbildung 14: Westernblot zum Nachweis der Auswirkung einer Überexpression von EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b auf die Kinase ERK2 in H23-Zellen.	53
Abbildung 15: Immunblot zum Nachweis der Auswirkung der Transfektion mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 in H23-Zellen.	55
Abbildung 16: Immunblot zum Nachweis der Auswirkung der Überexpression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b auf die Phosphorylierung der Kinase AKT in H23-Zellen.	56

Abbildung 17: Immunblot zur Analyse der Auswirkung der TGF β -Stimulation auf die Phosphorylierung der Kinase ERK2 in H23-Zellen.....	58
Abbildung 18: Immunblot zum Nachweis der Auswirkung der TGF β -Stimulation auf die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 in H23-Zellen.....	60
Abbildung 19: Immunblot zum Nachweis der Auswirkung der TGF β -Stimulation auf die Phosphorylierung der Kinase AKT in H23-Zellen.	63
Abbildung 20: Immunfluoreszenz zur Beurteilung der Transfektionseffizienz der EGFP-Zellklone und Immunblot zum Nachweis der stabilen Transfektion mit pEGFP, pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b in HCC44-Zellen.	65
Abbildung 21: Westernblot zum Nachweis der Phosphorylierung der Kinase AKT in stabil-transfizierten HCC44-Zellen.	66
Abbildung 22: Westernblot zum Nachweis der Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 in stabil-transfizierten HCC44-Zellen.	67
Abbildung 23: Westernblot zum Nachweis des Proteins Paxillin.....	69
Abbildung 24: Westernblot zum Nachweis der Auswirkungen der transienten Transfektion mit pEGFP-Rac1 und pEGFP-Rac1b auf das Intermediärfilament Vimentin.	70
Abbildung 25: Westernblot zum Nachweis des Proteins β -Aktin in pEGFP-Rac1- und pEGFP-Rac1b- transfizierten HCC44 Zellen.....	71
Abbildung 26: Westernblot zur Analyse der Auswirkung von stabil-exprimierten EGFP-Rac1 oder EGFP-Rac1b auf Paxillin in HCC44-Zellen.....	72
Abbildung 27: Immunblot zur Darstellung von Vimentin in stabil EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b-exprimierenden HCC44-Zellen.	73
Abbildung 28: Immunblot zur Darstellung der Auswirkung auf β -Aktin in stabil transfizierten EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b-exprimierenden HCC44-Zellen.	73

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	18
Tabelle 2: Zur transienten und stabilen Transfektion verwendete Plasmide.....	19
Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper.	21
Tabelle 4: Eingesetzte Sekundärantikörper.	22
Tabelle 5: Eichgerade zur Proteinbestimmung.....	25
Tabelle 6: Messangaben für zwei Trenn- und Sammelgele	26
Tabelle 7: Verwendete Plasmide	29
Tabelle 8: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase JNK (n=3)	43
Tabelle 9: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase ERK.....	47
Tabelle 10: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase p38.....	48
Tabelle 11: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase AKT.....	51
Tabelle 12: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase ERK2.....	59
Tabelle 13: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase p38.....	61
Tabelle 14: Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Westernblots hinsichtlich der Phosphorylierung der Kinase AKT.....	62

10 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Hamburg, den 17.01.2022

11 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit in den letzten Jahren beigetragen haben. Ganz besonders möchte ich folgenden Personen danken:

Herrn Prof. Dr. Andre Menke: Dafür, dass ich meine Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe erstellen durfte. Danke, für die Unterstützung während der experimentellen Arbeit im Labor und während der Fertigstellung der geschriebenen Form. Vielen Dank für die Anregungen, die Erklärungen und die Hilfsbereitschaft, aber auch Zuversicht, dass ich dieses Projekt beenden würde.

Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl: Danke für den inhaltlichen Input, die wissenschaftliche Expertise und die kollegiale Zusammenarbeit.

Den ganzen Kollegen aus der AG Menke und der AG Giehl. Besonders möchte ich mich hierbei bei Dirk Lohfink für die Einarbeitung, die Unterstützung zu jeder Zeit, das offene Ohr und die Hilfsbereitschaft auch in stressigen Situationen bedanken.

Auch dürfen meine Familie und Freunde nicht unerwähnt bleiben. Danke, dass ihr mich immer wieder ermutigt habt und euch so einigen Frust angehört habt. Danke für das Korrekturlesen und die Formatierungsarbeiten. Danke für eure Unterstützung und euer Verständnis in den letzten Jahren.

12 Literaturverzeichnis

- Atfi A, Djelloul S, Chastre E, Davis R, Gespach C (1997): Evidence for a Role of Rho-like GTPases and Stress-activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase (SAPK/JNK) in Transforming Growth Factor β -mediated Signaling. In: *J. Biol. Chem.* 272 (3): 1429–1432.
- Akhurst RJ und Balmain A (1999): Genetic events and the role of TGF beta in epithelial tumour progression. In: *J. Pathol.* 187 (1): 82-90.
- Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses, HL, Arteaga, CL (2000): Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for TGFbeta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. In: *J. Biol. Chem.* 275 (47): 36803-36810.
- Bertz, Joachim (Hg.) (2010): Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010; eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI. Robert-Koch-Institut. Berlin: Robert-Koch-Inst (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes).
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 392-424.
- Brown MC, Turner CE (2004): Paxillin: adapting to change. In: *Physiological reviews* 84 (4):1315–1339.
- Cargnello M, Roux PP (2011): Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75 (1): 50–83.
- Chang, F, Lemmon C, Lietha D, Eck M, Romer, L (2011): Tyrosine Phosphorylation of Rac1: A Role in Regulation of Cell Spreading. In: *PLoS One* 6 (12), e28587.
- Chen GC, Turano B, Ruest PJ, Hagel M, Settleman J, Thomas SM. (2005): Regulation of Rho and Rac signaling to the actin cytoskeleton by paxillin during *Drosophila* development. In: *Molecular and cellular biology* 25 (3): 979–987.
- Chen QY, Xu LQ, Jiao DM, YAO QH, Wang YY, Hu HZ, Wu YQ, Song J, Wu LJ (2011): Silencing of Rac1 modifies lung cancer cell migration, invasion and actin cytoskeleton rearrangements and enhances chemosensitivity to antitumor drugs. In: *International Journal of Molecular Medicine.* 28 (5): 769-776.

- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001): MAP Kinases. In: *Chem. Rev.* 101 (8): 2449–2476.
- Chin YR, Toker A (2009): Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. In: *Cellular signalling* 21 (4): S. 470–476.
- Coso OA, Teramoto H, Simonds WF, Gutkind JS (1996): Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. In: *J. Biol. Chem.* 271(8):3963-6.
- Deakin NO, Ballestrem C, Turner CE (2012): Paxillin and Hic-5 interaction with vinculin is differentially regulated by Rac1 and RhoA. In: *PLoS One* 7(5): e37990.
- Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY (2014): Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. In: *Curr Opin Cell Biol.* 31:56-66.
- Derynck R, Zhang YE. (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. In: *Nature* 425 (6958): 577–584.
- Devreotes P, Horwitz AR (2015): Signaling networks that regulate cell migration. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7 (8): a005959.
- Eblen ST, Slack JK, Weber MJ, Catling AD (2002): Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. In: *Molecular and cellular biology* 22 (17): 6023-6033.
- Faes S, Dormond O(2015): PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 16 (9): 21138–21152.
- Frey RS, Mulder, KM (1997). Involvement of ERK 2 and stressactivated protein kinase/JNK activation by TGF-beta in the negative growth control of breast cancer cells. In: *Cancer Res.* 57 (4): 628-633.
- Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B (2002): Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. In: *Br J Cancer.* 87(6):635-44.
- Giehl K, Imamichi Y, Menke A (2007): Smad4-independent TGF-beta signaling in tumor cell migration. In: *Cells, tissues, organs* 185 (1-3): 123–130.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5): 646–674.
- Gonzalez E, Kou R, Michel T (2006): Rac1 modulates sphingosine 1-phosphate-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways in vascular endothelial cells. In: *J Biol Chem.* 281(6): 3210-6.

- Han X, Stewart JE Jr, Bellis SL, Benveniste EN, Ding Q, Tachibana K, Grammer JR, Gladson CL (2001): TGF-beta1 up-regulates paxillin protein expression in malignant astrocytoma cells: requirement for a fibronectin substrate. In: *Oncogene*. 20(55): 7976-86.
- Hartsough MT and Mulder KM (1995). Transforming growth factor beta activation of p44 MAPK in proliferating cultures of epithelial cells. In: *J. Biol. Chem.* 270 (13): 7117-7124.
- Havel LS, Kline ER, Salgueiro AM, Marcus AI (2015): Vimentin regulates lung cancer cell adhesion through a VAV2-Rac1 pathway to control focal adhesion kinase activity. In: *Oncogene*. 34(15):1979-90.
- Herold, G. (2018). Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold.
- Higuchi M, Masuyama N, Fukui Y, Suzuki A, Gotoh Y (2001): Akt Mediates Rac/Cdc42-regulated Cell Motility in Growth Factor-Stimulated Cells and in Invasive PTEN Knockout Cells. In: *Curr Biol* 11: 1958-1962.
- Jagadeeswaran R, Surawska H, Krishnaswamy S, Janamanchi V, Mackinnon AC, Seiwert TY, Loganathan S, Kanteti R, Reichman T, Nallasura V, Schwartz S, Faoro L, Wang YC, Girard L, Tretiakova MS et al (2008): Paxillin is a target for somatic mutations in lung cancer: implications for cell growth and invasion. In: *Cancer Res*. 68(1):132-42.
- Kadara H, Kabbout M, Wistuba II (2012): Pulmonary adenocarcinoma: a renewed entity in 2011. In: *Respirology (Carlton, Vic.)* 17 (1): 50–65.
- Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K, Asami H, Ito Y, Yoshida KI (2004): Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. In: *Clin Cancer Res*. 10(14):4799-805
- Kazazian K, Go C, Wu H, Brashavitskaya O, Xu R, Dennis JW, Gingras AC, Swallow CJ (2017): Plk4 Promotes Cancer Invasion and Metastasis through Arp2/3 Complex Regulation of the Actin Cytoskeleton. In: *Cancer Res* 77 (2): 434–447.
- Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM. (2014): The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50 (1): 1–6.
- Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2019, https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/6012/krebs_in_deutschland_2015_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y, (Zugriff am: 05.11.2020, 12:48).

- Lamouille S, Derynck R (2007): Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. In: *J Cell Biol* 178(3): 437-51.
- Larsen JE, Minna JD (2011): Molecular biology of lung cancer: clinical implications. In: *Clinics in chest medicine* 32 (4): 703–740.
- Lei YY, Wang WJ, Me JH, Wang CL(2014): Mitogen-activated protein kinase signal transduction in solid tumors. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 15 (20): 8539–8548.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0,2018, AWMF-Registernummer: 020/007OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html> (Zugriff am: 08.01.2020, 21:16).
- Leivonen SK, Kähär VM (2007): Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis. In: *International journal of cancer* 121 (10): 2119–2124.
- Li G, Ying L, Wang H, Wei S, Chen J, Chen Y, Xu W et al. (2016): Rac1b enhances cell survival through activation of the JNK2/c-JUN/Cyclin-D1 and AKT2/MCL1 pathways. In: *Oncotarget*. 7 (14):17970-17985.
- Lien EC, Dibble CC, Toker A (2017): PI3K signaling in cancer: beyond AKT. In: *Current Opinion in Cell Biology* 45: 62–71.
- López-Colomé AM, Lee-Rivera I, Benavides-Hidalgo R, López E (2017): Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. In: *Journal of Hematology & Oncology* 10 (1): 50.
- Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P (2016): Risk factors for lung cancer worldwide. In: *The European respiratory journal* 48 (3): 889–902.
- Manning BD, Toker A (2017): AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. In: *Cell* 169 (3): 381–405.
- Matos P, Oliveira C, Velho S, Gonçalves V, da Costa LT, Moyer MP, Seruca R, Jordan P (2008): B-Raf(V600E) cooperates with alternative spliced Rac1b to sustain colorectal cancer cell survival. In: *Gastroenterology*. 135(3):899-906.
- Mattiuzzi C, Lippi G (2019): Current Cancer Epidemiology. In: *Journal of epidemiology and global health* 9 (4): 217–222.
- Melzer C, Hass R, von der Ohe J, Lehnert H, Ungefroren H (2017): The role of TGF- β and its crosstalk with RAC1/RAC1b signaling in breast and pancreas carcinoma. In: *Cell Commun Signal*. 15(1):19.

- Meriane M, Charrasse S, Comunale F, Gauthier-Rouvière C (2002): Transforming growth factor β activates Rac1 and Cdc42Hs GTPases and the JNK pathway in skeletal muscle cells. In: *Biology of the Cell* 94 (7-8), S. 535–543.
- Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M (1995): Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. In: *Cell* 81 (7): 1147–1157.
- Mitchell L, Hobbs GA, Aghajanian A, Campbell SL (2013): Redox Regulation of Ras and Rho GTPases: Mechanism and Function. In: *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (3): 250–258.
- Miyazono K, Katsuno Y, Koinuma D, Ehata S, Morikawa M (2018): Intracellular and extracellular TGF- β signaling in cancer: some recent topics. In: *Frontiers of medicine* 12 (4): 387–411.
- Mucsi I, Skorecki, KL, Goldberg HJ (1996): ERK and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of TGF- β 1 on gene expression. In: *J. Biol. Chem.* 271 (28), 16567-16572.
- Niba ETE, Nagaya H, Kanno T, Tsuchiya A, Gotoh A, Tabata C, Kuribayashi K, Nakano T, Nishizaki T (2013): Crosstalk between PI3 kinase/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK pathways downstream PDGF receptor. In: *Cellular physiology and biochemistry* 31 (6): 905–913.
- Nimnual AS, Taylor LJ, Nyako M, Jeng HH, Bar-Sagi D (2010): Perturbation of cytoskeleton dynamics by the opposing effects of Rac1 and Rac1b. In: *Small GTPases* 1 (2): 89–97.
- Orlichenko L, Geyer R, Yanagisawa M, Khauv D, Radisky ES, Anastasiadis PZ, Radisky DC (2010): The 19-amino acid insertion in the tumor-associated splice isoform Rac1b confers specific binding to p120 catenin. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (25):19153–19161.
- Parri M, Chiarugi P (2010): Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. In: *Cell communication and signaling* 8: 23.
- Peckham M, Miller G, Wells C, Zicha D, Dunn GA (2001): Specific changes to the mechanism of cell locomotion induced by overexpression of beta-actin. In: *J Cell Sci.* 114(7):1367-77.
- Porter AP, Papaioannou A, Malliri A (2016): Deregulation of Rho GTPases in cancer. In: *Small GTPases* 7 (3): 123–138.

- Pirie K, Peto R, Reeves GK, Green J, Beral V (2013): Million Women Study Collaborators. The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK. In: *Lancet* 381(9861):133-141.
- Price LS, Collard JG (2001): Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion. In: *Semin Cancer Biol.* 11(2):167-73.
- Principe DR, Diaz AM, Torres C, Mangan RJ, DeCant B, McKinney R, Tsao MS, Lowy A, Munshi HG, Jung B, Grippo PJ (2017): TGF β engages MEK/ERK to differentially regulate benign and malignant pancreas cell function. In: *Oncogene*. 36(30):4336-4348.
- Raftopoulou M, Hall A (2004): Cell migration: Rho GTPases lead the way. In: *Developmental biology* 265 (1):23–32.
- Ridley AJ (2001): Rho GTPases and cell migration. In: *Journal of cell science* 114 (Pt 15): 2713–2722.
- Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, Harbeck N, Schmitt M, Lengyel E (2000): Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. In: *Oncogene* 19 (26): 3013–3020.
- Seiz JR, Klinke J, Scharlibbe L, Lohfink D, Heipel M, Ungefroren H, Giehl K, Menke A (2020): Different signaling and functionality of Rac1 and Rac1b in the progression of lung adenocarcinoma. In: *Biol Chem*. 401(4):517-531.
- Sharma P, Alsharif S, Fallatah A, Chung BM (2019): Intermediate Filaments as Effectors of Cancer Development and Metastasis: A Focus on Keratins, Vimentin, and Nestin. In: *Cells* 8 (5): 497.
- Simiczyjew A, Mazur AJ, Dratkiewicz E, Nowak D (2017): Involvement of β - and γ -actin isoforms in actin cytoskeleton organization and migration abilities of bleb-forming human colon cancer cells. In: *PloS one* 12 (3): e0173709.
- Simonato L, AgudoA, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Boffetta, Paolo et al. (2001): Lung cancer and cigarette smoking in Europe. An update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. In: *Int. J. Cancer* 91 (6): 876–887.
- Singh A, Karnoub AE, Palmby TR, Lengyel E, SondekJ, Der CJ (2004): Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. In: *Oncogen* 23 (58): 9369–9380.
- Sit ST, Manser E (2011): Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 5): 679–683.

- Stallings-Mann M L, Waldmann J, Zhang Y, Miller E, Gauthier ML, Visscher DW et al. (2012): Matrix metalloproteinase induction of Rac1b, a key effector of lung cancer progression. In: *Science translational medicine* 4 (142): 142ra95.
- Thiery J (2002): Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. In: *Nature Reviews Cancer* 2 (6): 442–454.
- Tolias K, Carpenter CL (2000): In vitro interaction of phosphoinositide-4-phosphate 5-kinases with Rac. In: *Methods in enzymology* 325: 190–200.
- Tolias K, Hartwig JH, Ishihara H, Shibasaki Y, Cantley LC, Carpenter CL. (2000): Type Ia phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. In: *Current Biology* 10 (3): 153–156.
- Ungefroren H, Otterbein H, Fiedler C, Mihara K, Hollenberg MD, Gieseler F, Lehnert H, Witte D (2019): RAC1B Suppresses TGF- β 1-Dependent Cell Migration in Pancreatic Carcinoma Cells through Inhibition of the TGF- β Type I Receptor ALK5. In: *Cancers (Basel)* 11(5), 691.
- Ungefroren H, Sebens S, Giehl K, Helm O, Groth S, Fändrich F, Röcken C, Sipos B, Lehnert H, Gieseler F (2014): Rac1b negatively regulates TGF- β 1-induced cell motility in pancreatic ductal epithelial cells by suppressing Smad signalling. In: *Oncotarget* 5 (1): 277–290.
- Ungefroren H, Witte D, Lehnert H (2018): The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- β -induced EMT and cell motility in cancer. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 247 (3): 451–461.
- Vandekerckhove J, Weber K (1978): At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. In: *Journal of molecular biology* 126 (4): 783–802.
- Wakefield LM, Roberts AB (2002): TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 12 (1): 22–29.
- Walsh JE, Young MR (2011): TGF-beta regulation of focal adhesion proteins and motility of premalignant oral lesions via protein phosphatase 1. In: *Anticancer Res.* 31(10):3159-64.
- Westwick JK, Lambert QT, Clark GJ, Symons M, Van Aelst L, Pestell RG, Der CJ (1997): Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. In: *Mol Cell Biol.* 17(3):1324-35.
- Witte D, Otterbein H, Forster M, Giehl K, Zeiser R, Lehnert H, Ungefroren H (2017): Negative regulation of TGF-beta1-induced MKK6-p38 and MEK-ERK signalling and epithelial-mesenchymal transition by Rac1b. In: *Sci. Rep.* 7 (1): 17313.

- Yu L, Hébert MC, Zhang YE (2002): TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. In: *EMBO J.* 21(14):3749-59.
- Zhao J, Jie Q, Li G, Li Y, Liu B, Li, Hongqiang L, Luo J, Qin X, Li Z, Wei Y (2018): Rac1 promotes the survival of H9c2 cells during serum deficiency targeting JNK/c-JUN/Cyclin-D1 and AKT2/MCL1 pathways. In: *International journal of medical sciences* 15 (10): S. 1062–1071.
- Zarubin T, Han J (2005): Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. In: *Cell Research* 15 (1): 11–18.
- Zhang S, Han J, Sells MA, Knaus UG, Ulevitch RJ, Bokoch GM (1995): Rho family GTPases regulate p38 MAP kinase through the downstream mediator Pak1. In: *J Biol Chem* 270 (41): 23934–6.
- Zhang Q, Helfand BT, Jang TL, Zhu LJ, Chen L, Yang XJ, Kozlowski J, Smith N, Kundu SD, Yang G, Raji AA, Javonovic B, Pins M, Lindholm P, Guo Y, Catalona WJ, Lee C (2009): Nuclear factor-kappaB-mediated transforming growth factor-beta-induced expression of vimentin is an independent predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. In: *Clin Cancer Res.* 15(10):3557-67.
- Zhou C, Licciulli S, Avila JL, Cho M, Troutman S, Jiang P, Kossenkov AV, Showe LC, Liu Q, Vachani A et al (2013): The Rac1 splice form Rac1b promotes K-ras-induced lung tumorigenesis. In: *Oncogene* 32 (7):903–909.
- Zugasti O, Rul W, Roux P, Peyssonnaud C, Eychene A, Franke TF, Fort P, Hibner U (2001): Raf-MEK-Erk cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. In: *Mol Cell Biol.* 21(19):6706-17.
- Zuo Y, Shields SK, Chakraborty C (2006): Enhanced intrinsic migration of aggressive breast cancer cells by inhibition of Rac1 GTPase. In: *Biochem Biophys Res Commun* 351(2): 361-367.

