

# **Rac1b-spezifische Effekte und Auswirkungen der 3D-Kultivierung auf Differenzierung und Signaltransduktion in NSCLC-Zelllinien**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Julia Raphaela Seiz

aus Kirchheim

März 2019

Die vorliegende Arbeit wurde an der Professur für „Molekulare Onkologie solider Tumore“, des Fachbereichs 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Oktober 2015 bis Februar 2019 unter der Leitung von Prof. Dr. Andre Menke angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Undraga Schagdarsurengin  
Institut für Molekulare Andrologie und Urologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Schubertstraße 81, 35392 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andre Menke  
Professur für Molekulare Onkologie solider Tumore  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Aulweg 128, 35392 Gießen

Datum der Disputation: 21.10.2019

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	6
2	Abstract .....	7
3	Einleitung.....	8
3.1	Humanen Lungentumore.....	8
3.2	Erhöhte Expression der Rho-GTPasen Rac1 und Rac1b in humanen Lungentumoren .....	9
3.3	Rho-GTPasen.....	10
3.3.1	Aktivierungszyklus der Rho-GTPasen .....	10
3.3.2	Die Rho-GTPasen Rac1 und Rac1b .....	11
3.3.3	Rac-induzierte Signalwege.....	12
3.3.4	Regulation des Aktin-Zytoskeletts.....	17
3.3.5	Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) .....	17
3.3.6	E-Cadherin-vermittelte Zell/Zell-Kontakte .....	18
3.3.7	Integrin-vermittelte Zell/Matrix-Kontakte .....	19
3.4	3D-Zellkultur .....	23
3.4.1	Unterschiede zwischen der 2D- und 3D-Zellkultur.....	23
3.4.2	3D-Kultivierungsmethoden .....	24
4	Zielsetzung .....	28
5	Material und Methoden.....	29
5.1	Material.....	29
5.1.1	Humane Zelllinien.....	29
5.1.2	Escherichia coli-Stämme.....	29
5.1.3	RT <sup>2</sup> Profiler™ PCR Array .....	29
5.1.4	Primer .....	29
5.1.5	Plasmide.....	30
5.1.6	Primär-Antikörper .....	32
5.1.7	Sekundär-Antikörper .....	34
5.1.9	Zellbiologische und molekularbiologische Kits.....	35
5.1.10	Marker .....	35
5.1.11	Chemikalien.....	35
5.1.12	Gebrauchswaren .....	36
5.1.13	Geräte.....	37

5.1.14	Software .....	38
5.2	Methoden.....	39
5.2.1	2D Zellkultur .....	39
5.2.2	3-dimensionale (3D) Zellkultur .....	45
5.2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	48
5.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	55
5.2.5	Statistische Analyse .....	61
6	Ergebnis .....	62
6.1	EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 beeinflussen die MAPK-Aktivität in HEK293-Zellen.....	62
6.2	Endogene Expression von Rac1b und Rac1 in humanen NSCLC-Zelllinien.....	65
6.3	Rac-induzierte Regulation des Differenzierungsstatus und der Gentranskription .....	65
6.4	Charakterisierung von stabil EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellen	68
6.5	Stabil exprimiertes EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 steigern die Proliferation.....	71
6.6	Aktivierung von Proteinkinasen durch EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1.....	73
6.7	EGFP-Rac1, aber nicht EGFP-Rac1b, bewirkt eine De-Differenzierung der H23-Zellen..	74
6.8	EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 bewirken Veränderungen des Aktin-Zytoskelett .....	76
6.9	EGFP-Rac1, aber nicht EGFP-Rac1b, bewirkte eine Verschiebung von E- zu N-Cadherin-vermittelten Zell/Zell-Kontakten.....	78
6.10	Rac1b-Knockdown in EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen .....	79
6.11	Die 3D-Kultivierung stabil EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-exprimierender H23-Zellen ...	81
6.12	Vergleich der verschiedenen 3D-Kultivierungsmodelle .....	84
6.12.1	Die magnetische Levitation .....	84
6.12.2	3D-Kultivierung in einer Hydrogelmatrix.....	86
6.13	Die 3D-Matrigel-Kultivierung bewirkt eine epitheliale Differenzierung der H358- und H23-Zellen .....	88
6.14	Die 3D-Kultivierung bewirkte eine Reduktion der ZEB2-Expression .....	90
6.15	Änderungen der Signaltransduktion durch die 3D-Kultivierung in einer Matrigelmatrix.....	92
6.16	Genexpressionsanalysen identifizieren unterschiedlich regulierte Gen-Sets in 3D-kultivierten H358- und H23-Zellen.....	93
6.17	Die Validierung der RT <sup>2</sup> Profiler PCR Array-Daten .....	95
6.17.1	H358 PCR Arrays .....	95
6.17.2	H23 PCR Arrays .....	97
6.18	Ausbildung von 3D-Strukturen auf einer dünnen Matrigelschicht .....	99

6.19	Analyse des Differenzierungsverhaltens und der MAPK-Signaltransduktion im modifizierten „3D on-top“-Matrigel-Kultivierungsmodell.....	101
7	Diskussion .....	104
7.1	Die Rolle von Rac1b in der Lungentumor-Progression.....	104
7.1.1	Effekte von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 auf die Proliferation .....	104
7.1.2	Antagonistische Effekte von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 auf die epitheliale Differenzierung .....	106
7.1.3	Einfluss von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 auf die Migration .....	108
7.1.4	EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 in der Genregulation.....	110
7.1.5	Der Einfluss der 3-Dimensionalität auf EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-induzierte Zelldifferenzierung.....	112
7.2	3D-Kultivierungsmethoden .....	113
7.2.1	Die 3D-Kultivierung kann eine epitheliale Differenzierung der Zellen induzieren .....	114
7.2.2	Änderung in der Kinase-Aktivität durch die 3D-Kultivierung .....	117
7.2.3	Ausblick: Einsatz der 3D-Zellkultivierung in der Medikamenten-Entwicklung.....	119
8	Abkürzungsverzeichnis .....	120
9	Literaturverzeichnis .....	125
10	Eidesstattliche Erklärung.....	134
11	Danksagung .....	135
12	Anhang .....	136
12.1	Ergänzende Abbildungen .....	136
12.2	Lebenslauf.....	138
12.3	Konferenzbeiträge .....	139

## 1 Zusammenfassung

Die Rho-GTPase Rac1 und seine Spleiß-Isoform Rac1b sind in vielen humanen, nicht-kleinzelligen Lungentumoren (NSCLC) überexprimiert. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie wurde jedoch in vielen Studien nicht zwischen diesen beiden Rac-Isoformen unterschieden, weswegen bisher kaum Rac1b-spezifische Funktionen bekannt sind. Rac1b enthält ein zusätzliches Exon 3b, was in einer 19 Aminosäure-langen Insertion resultiert. Dadurch liegt Rac1b hauptsächlich in seinem aktiven, GTP-gebundenen Zustand vor.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Rac1b auf die Proliferation, den Differenzierungsstatus, die Migrationsfähigkeit und die Genregulation untersucht. Hierfür wurde die Lungenadenokarzinom-Zelllinie H23 verwendet, die transient oder stabil EGFP, EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b exprimiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass stabil exprimierte EGFP-Rac-Isoformen die Proliferationsgeschwindigkeit der H23-Zellen steigerten, was mit einer erhöhten Aktivität der Proteinkinasen p38, JNK2 und Akt korrelierte.

Durch die Analyse des Differenzierungsstatus, der Migrationsfähigkeit und der Genregulation wurden Rac1b-spezifische Funktionen in den stabil EGFP-Rac-exprimierenden H23-Klonen identifiziert, die sich von den Rac1-induzierten Effekten unterschieden: Während EGFP-Rac1 einen *Cadherin Switch* von E-Cadherin zu N-Cadherin und somit eine EMT in den H23-Zellen induziert, wurde der Differenzierungsstatus der stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen, verglichen mit den Kontrollzellen, nicht verändert. Dies geht mit einer unveränderten Migrationsgeschwindigkeit der stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen einher, die in stabil EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellen reduziert vorlag. Außerdem wurde in Genreporter-Assays gezeigt, dass transient exprimiertes HA-Rac1b(G12V), im Gegensatz zu HA-Rac1(G12V), keine Promotoraktivierung verschiedener Gene bewirken kann. Nur die stabile Expression von EGFP-Rac1b bewirkte in H23-Zellen eine Aktivierung des SRE.L-Reporterkonstrukts, was auf eine Adaptation durch die langfristige Rac1b-Expression zurückgeführt werden könnte. In dieser Arbeit konnte für Rac1b keine tumor-fördernde Funktion in der NSCLC-Zelllinie H23 identifiziert werden.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit verschiedene 3D-Kultivierungsmethoden miteinander verglichen, die weitere Einflüsse auf das Zellverhalten berücksichtigen und so die komplexe Situation im Tumor eher nachstellen können als 2D-Kulturen. Darunter fallen das Wachstum als 3-dimensionaler Zellverbund und die Kultivierung in einer Hydrogelmatrix. Dabei wurden die NSCLC-Zelllinien H358 und H23 mit verschiedenen 3D-Kultivierungsmethoden kultiviert. Durch die anschließende Analyse der Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakte wurde die Interaktion der Tumorzellen untereinander und mit ihrer Mikroumgebung unter diesen Kultivierungsbedingungen charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass die magnetische Levitation und die Kultivierung in und auf einer Matrigelmatrix verglichen mit der 2D-Kultivierung zu einer epithelialen Differenzierung, veränderten Aktivität der Proteinkinasen ERK1/2, p38 und Akt sowie einer veränderten Genexpression in den Zellen führt. Zusammenfassend stellt die modifizierte „3D on-top“-Kultivierung auf einer dünnen Matrigelschicht die geeignetste 3D-Kultivierungsmethode dar, um die *in vivo*-Situation von NSCLC nachzustellen und besser verstehen zu können.

## 2 Abstract

The Rho-GTPase Rac1 and its splice isoform Rac1b are overexpressed in many human non-small cell lung cancer. Due to their high sequence homology, most studies did not differentiate between these two isoforms and Rac1b-specific functions are barely characterized so far. Rac1b consists of an additional exon 3b, resulting in a 19 amino acid insertion and is primarily detectable in its active, GTP-bound form.

In this study, the impact of Rac1b on tumor cell proliferation, differentiation status, migration, and gene regulation were analyzed. Therefore, the lung adenocarcinoma cell line H23 was used that transiently or stably expressed EGFP, EGFP-Rac1 or EGFP-Rac1b. It could be shown that stably expressed Rac isoforms both increased the proliferation rate of the H23 cells correlating with an increased activity of the protein kinases p38, JNK2 and Akt.

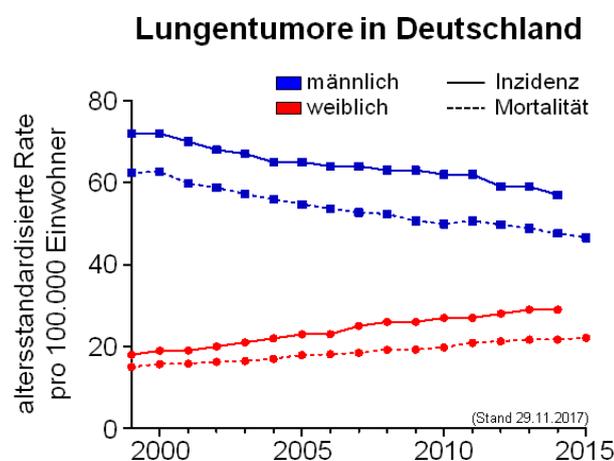
By analyzing the differentiation status, migration and gene regulation in H23 cell clones stably expressing EGFP-Rac isoforms, we identified Rac1b-specific functions that differentiate from effects induced by Rac1: While EGFP-Rac1 can induce a cadherin switch from E-Cadherin to N-Cadherin and thus an EMT in H23 cells, the differentiation status of H23 cells stably expressing EGFP-Rac1b remains comparable to that of control cells. The stable expression of EGFP-Rac1b had no effect on the migration rate of these cell clones, whereas in H23 cells stably expressing EGFP-Rac1 the migration rate is reduced. Furthermore, gene reporter assays showed that the transient expression of HA-Rac1b(G12V), in contrast to HA-Rac1(G12V), did not result in any activation of several promoter constructs. On the contrary, stably expressed EGFP-Rac1b induced an activation of the SRE.L reporter construct. Our results do not support a tumor-promoting function of Rac1b in the NSCLC cell line H23.

Furthermore, in this study, different 3D cultivation methods were compared which consider the role of additional factors in the cellular behavior in order to mimic the complex situation in a tumor. This includes cellular growth in a 3-dimensional association of cells and cultivation in a hydrogel matrix. Here, the NSCLC cell lines H358 and H23 were used in different 3D cultivation methods. By analyzing cell/cell and cell/matrix contacts, the interaction of the tumor cells with each other and with their microenvironment was characterized. We could show that magnetic levitation and cultivation in and on a Matrigel matrix can lead to epithelial differentiation, altered activity of the protein kinases ERK1/2, p38 and Akt as well as to a modified gene expression compared to 2D cultivation. This suggests that the modified “3D on-top” cultivation on a thin Matrigel matrix is one of the most appropriate methods to cultivate cells in 3D to mimic and further comprehend the *in vivo* situation of non-small cell lung cancer.

## 3 Einleitung

### 3.1 Humane Lungentumore

Humane Lungentumore zählen zu den häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland. Im Jahr 2013 (Stand 2017) wurde in Deutschland bei etwa 53.300 Menschen Lungenkrebs diagnostiziert. Demnach ist sie bei Männern die zweithäufigste und bei Frauen die dritthäufigste Tumorerkrankung [1]. Die absoluten Zahlen zeigen dabei, dass beinahe doppelt so viele Männer wie Frauen betroffen sind (Männer: 34.690; Frauen: 18.800), was sich auch in der altersstandardisierten Inzidenz- und Mortalitätsrate widerspiegelt (Abbildung 1) [1].



**Abbildung 1 Altersstandardisierte Inzidenz- und Mortalitätsrate von Lungentumoren in Deutschland.** Daten des Zentrums für Krebsregisterkarten des Robert-Koch-Instituts belegen eine Abnahme der Inzidenz und Mortalität von Lungentumoren bei den Männern und einen Anstieg bei den Frauen. Diese Daten basieren auf dem Stand von November 2017 [1].

Aufgrund ihrer Histologie können humane Lungentumore in zwei Gruppen unterteilt werden: in kleinzellige (SCLC, *small cell lung cancer*) und in nicht-kleinzellige (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) Lungentumore.

Die *World Health Organization* klassifizierte 1999 SCLC als einen malignen epithelialen Tumor aus kleinen Zellen mit wenig Zytoplasma und unscharfen Zellgrenzen. Die Zellen haben eine runde, ovale oder spindelförmige Form und weisen häufig Verformungen des Zellkerns und einen hohen Mitose-Index auf [2]. Bei etwa 15 % der neu-diagnostizierten Lungentumore handelt es sich um SCLC, der eine sehr aggressive Tumorart darstellt und schon in frühen Stadien disseminiert und Metastasen (häufig im Gehirn) ausbildet. Daher sind die meisten SCLC-Patienten bei der Diagnose bereits in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Mehr als 95 % der diagnostizierten SCLC-Patienten sind Raucher [2].

Etwa 85 % der neu-diagnostizierten Lungentumore gehört den NSCLC an. Diese lassen sich weiter in drei Subtypen unterteilen: Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und

großzellige Karzinome. Diese drei Subtypen unterscheiden sich durch den zellulären Ursprung des Karzinoms, durch die Lokalisation in der Lunge und durch das Wachstumsverhalten voneinander [3, 4].

Das großzellige Lungenkarzinom wird in etwa 5-10 % der diagnostizierten Lungentumore nachgewiesen und besteht aus undifferenzierten bis kaum differenzierten Zellen [3].

Das Plattenepithelkarzinom wird in 25-30 % der Fälle diagnostiziert und tritt nur sehr selten bei Nicht-Rauchern auf (<10 %) [5]. Dieser Subtyp entsteht aus transformierten, basalen Zellen der zentralen Atemwege [3], weswegen dieser Tumor hauptsächlich im Zentrum der Lunge diagnostiziert wird [6].

Der in Rauchern und Nichtrauchern am häufigsten vorkommende Lungentumor ist das Adenokarzinom, das etwa die Hälfte aller Lungentumor-Diagnosen ausmacht. Dieser Subtyp entsteht durch die maligne Transformation des Drüsenepithels (Typ II Pneumozyten; Clara-Zellen) [3] und kann daher durch eine Muzin-Färbung immunhistologisch nachgewiesen werden [7]. Die Diagnose dieses Tumortyps erfolgt durch den Nachweis der Biomarker EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor) und ALK (anaplastische Lymphomkinase) [7]. Eine aktivierende Mutation des EGFRs tritt schon früh in der Entstehung des humanen Lungenadenokarzinoms auf und aktiviert die PI3K/Akt- und Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwege [7], was unter anderem eine Zunahme der Proliferationsrate der Tumorzellen zur Folge hat. Weitere epidemiologische Studien konnten zeigen, dass aktivierende *EGFR*-Mutationen hauptsächlich bei Nichtrauchern, Frauen und Asiaten nachgewiesen werden konnten [8, 9]. Bei Rauchern wurden dagegen hauptsächlich aktivierende *K-RAS* (*Kristen rat sarcoma*)-Mutationen für die Entstehung der Adenokarzinome verantwortlich gemacht [10].

### **3.2 Erhöhte Expression der Rho-GTPasen Rac1 und Rac1b in humanen Lungentumoren**

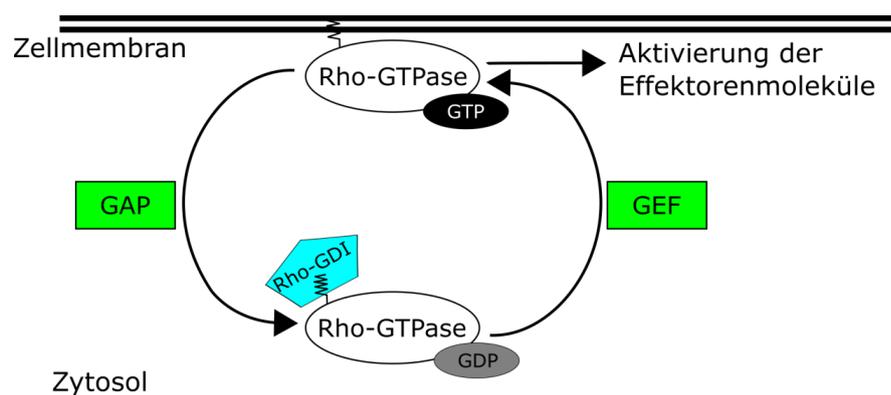
Um Therapien gegen Lungentumore zu verbessern, müssen weitere Zielstrukturen identifiziert werden, die in der Entstehung und Entwicklung humaner Lungentumore eine wichtige Rolle spielen. Um Lungentumor-spezifische Mutationen zu identifizieren, analysierten Liu *et al.* 19 etablierte Lungenkrebszelllinien und 3 Lungentumor-Gewebepaare mittels *Next Generation*-Sequenzierung [11]. Ein Vergleich der Ergebnisse aus der Transkriptom-Sequenzierung von Tumor- und Normalgewebe ermöglichte die Analyse von Spleiß-Isoformen und deren differenzielle Expression in Lungentumoren. Dabei wurde für die Rho (*Ras homologous*)-GTPase Rac1 eine 2-fache Hochregulation und für dessen Spleißvariante Rac1b eine 10-fache Hochregulation in Lungentumoren nachgewiesen [11]. Immunhistochemische Färbungen bestätigten eine deutliche Zunahme von Rac1 in Lungentumorgeweben. Durch Überlebenszeitanalysen von NSCLC-Patienten wurde zudem nachgewiesen, dass eine hohe Rac1-Expression das progressionsfreie und generelle

Überleben deutlich verkürzt, verglichen mit einer geringeren Rac1-Expression [12, 13]. Außerdem wurde eine verstärkte Rac1b-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene in Lungentumorgewebe verglichen mit Normalgewebe gezeigt. Für die Tumor-fördernden Eigenschaften von Rac1b scheinen zusätzliche, aktivierende *K-RAS*-Mutationen notwendig zu sein [14-16].

### 3.3 Rho-GTPasen

#### 3.3.1 Aktivierungszyklus der Rho-GTPasen

Rho-GTPasen sind eine Unterfamilie der Ras-verwandten kleinen GTPasen und bestehen aus 22 Mitgliedern, die in allen Säugetieren vorkommen. Zu den klassischen Rho-GTPasen gehören die Rho-, Cdc42- und die Rac- (*Ras-related-C3 botulinum toxin substrate*) Proteine, wobei RhoA, Cdc42 und Rac1 die am besten charakterisierten Mitglieder darstellen [17, 18]. Wie alle regulatorischen GTPasen wirken die Rho-GTPasen als molekulare Schalter: Sie wechseln dabei zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand.



**Abbildung 2 Aktivierungszyklus der Rho-GTPasen.**

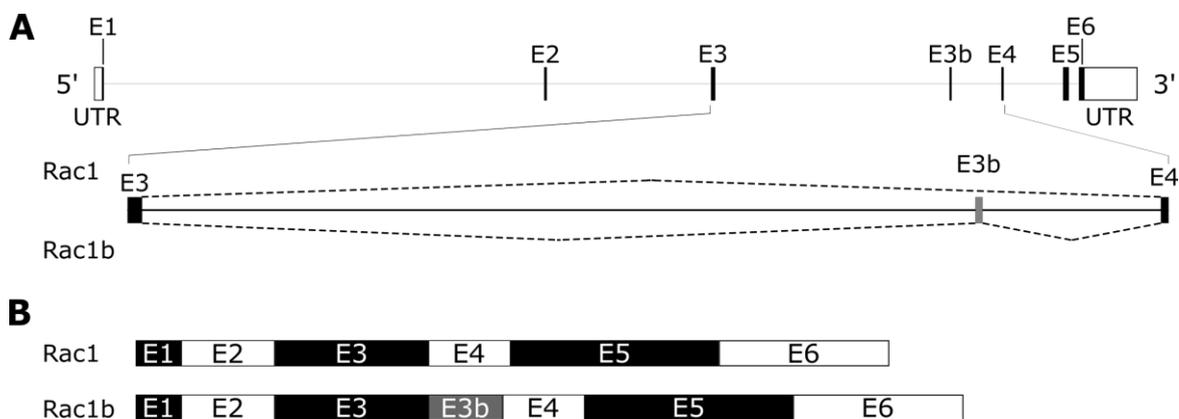
Die Aktivierung der Rho-GTPase erfolgt durch GEFs (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren), die einen Austausch von GDP gegen ein GTP bewirken. Die aktive Rho-GTPase ist an der Zellmembran lokalisiert, wo sie mit Effektorproteinen interagieren kann. Für die Inaktivierung katalysieren GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) die Hydrolyse des gebundenen Nukleotids. Im Zytosol verhindern Rho-GDIs (Guanin-Dissoziations-Inhibitoren) die erneute Aktivierung der Rho-GTPase.

Dieser Zyklus wird durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert. Während der Aktivierung binden GEFs an die Rho-GTPase und katalysieren den Austausch des gebundenen GDPs gegen ein GTP. Anschließend wandert die aktive, GTP-gebundene Rho-GTPase an die Membran, wo sie mit ihren Effektorproteinen interagieren kann. Für die Deaktivierung binden GAPs an die Rho-GTPase und beschleunigen die Hydrolyse von GTP zu GDP. Die inaktive, GDP-gebundene Rho-GTPase ist in diesem Zustand im Zytoplasma lokalisiert. Dort wird sie von Guanin-Dissoziations-Inhibitoren (Rho-GDIs) gebunden, wodurch eine Dissoziation des GDPs verhindert wird [17, 19, 20]. Zusammen mit der Maskierung der Geranylgeranyl-

Modifikation nahe des C-Terminus [21, 22] wird eine erneute Aktivierung und Translokation an die Zellmembran verhindert (Abbildung 2). Auf diese Weise regulieren die Rho-GTPasen mehr als 70 Effektormoleküle, die an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt sind. Darunter fallen unter anderem die Regulation des Aktin-Zytoskeletts, die Migration, die Proliferation und die Genexpression [23].

### 3.3.2 Die Rho-GTPasen Rac1 und Rac1b

In dieser Arbeit werden die Rac1- und Rac1b-induzierten Effekte in Lungentumorzellen untersucht. Rac1 gehört zu den klassischen und am besten charakterisierten Rho-GTPasen und wird ubiquitär exprimiert. Es spielt eine essentielle Rolle in der Entwicklung eines Organismus. So ist ein homozygoter *rac1*-Knockout in murinen, embryonalen Stammzellen schon in frühen Entwicklungsstadien letal (E9.5) [24], weshalb die Funktion von Rac1 in Geweben und Tumorarten nur mithilfe von konditionellen Knockout-Modellen untersucht werden konnte. Für Pankreas- und Lungentumore wurden konditionelle Knockout-Mäuse generiert, die die Funktion von Rac1 in der Tumorgenese weiter aufklären sollten [25, 26]. Dabei wurde in beiden Tumorarten eine Verzögerung der Tumorentstehung durch das Fehlen von Rac1 beobachtet, was auf eine pro-tumorigene Eigenschaft von Rac1 hinweist. Diese Eigenschaft wird durch die Überexpression von Rac1 in Brust-, Magen-, und Hodenkarzinomen sowie in oralen Plattenepithelkarzinomen weiter unterstützt [27-30].

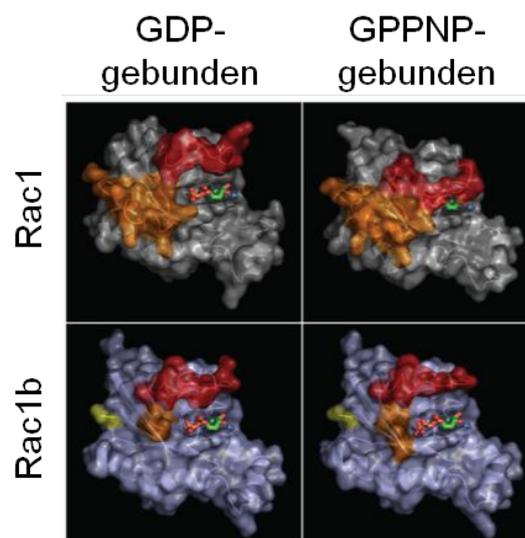


**Abbildung 3 Genstruktur der Rho-GTPasen Rac1 und Rac1b.**

**[A]** Darstellung des Rac-Gens mit seinen Exons (E1-E6) und Introns inkl. 5'- und 3'-UTR (untranslatierte Region). Der vergrößerte Bereich von E3 bis E4 zeigt die unterschiedlichen Spleißvarianten Rac1 (oben) und Rac1b (unten). **[B]** Schema der gespleißten mRNA von Rac1 bzw. Rac1b. Rac1b enthält das alternative Exon 3b (E3b).

Bei der Rho-GTPase Rac1b handelt es sich um eine Spleiß-Isoform von Rac1, die ein zusätzliches Exon 3b besitzt. Dabei werden 57 Nukleotide bzw. 19 Aminosäuren im Leserahmen (zwischen Kodon 75 und 76) eingebaut (Abbildung 3). Die 19 zusätzlichen Aminosäuren befinden sich direkt hinter der sog. Switch II-Region. Die Switch-Regionen sind an den meisten Protein/Protein-Interaktionen von Rac1 bzw. Rac1b mit ihren Effektorproteinen beteiligt [31]. Zwischen den beiden Switch-Regionen befindet sich die

Nukleotid-Bindestelle, die eine Konformationsänderung der Rac-Proteine in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids (GDP oder GTP) bewirkt (Abbildung 4). Dieser strukturelle Unterschied nimmt durch die GPPNP-Bindung (nicht-hydrolysierbares GTP-Analog, Abbildung 4) an das Rac1-Protein eine geschlossene Konformation an, bei der die beiden Switch-Regionen eng beieinander liegen, während die GPPNP-Bindung an das Rac1b-Protein eine geöffnete Konformation aufrechterhält und die Switch-Regionen weiter voneinander entfernt bleiben (Abbildung 4) [32]. Dies resultiert in einer unterschiedlichen Aktivierbarkeit der beiden Rac-Isoformen.



**Abbildung 4 Konformationsänderung von Rac1 und Rac1b durch die Bindung von Nukleotiden.**

Die Konformation der Switch I (rot)- und Switch II (orange)-Region wird durch die Bindung von GDP bzw. GPPNP (nicht-hydrolysierbares GTP-Analog) beeinflusst. Die Bindung von GPPNP bewirkt bei Rac1 eine geschlossene Switch I-Region. Diese bleibt bei Rac1b trotz GPPNP-Bindung geöffnet. Diese Abbildung wurde mit der Genehmigung des Verlages aus Orlichenko *et al.* entnommen [32].

Biochemische Analysen zeigen für Rac1b einen schnelleren Austausch von GDP zu GTP sowie eine beeinträchtigte GTP-Hydrolyse, die durch die offene Konformation der Switch-Regionen bedingt ist. Dadurch fehlen stabilisierende strukturelle Elemente nahe der GTP-Hydrolyse-Domäne. Des Weiteren wird Rac1b nicht durch Rho-GDIs gebunden [33] und kann daher nicht im Zytoplasma zurückgehalten werden. Rac1b liegt im Gegensatz zu Rac1 somit hauptsächlich als aktive, GTP-gebundene Rho-GTPase an der Zellmembran vor [34].

### 3.3.3 Rac-induzierte Signalwege

#### 3.3.3.1 Serin/Threonin-Kinase PAK

Die Aktivierung der Rho-GTPase Rac1 stimuliert mehrere Signalwege, die an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt sind.

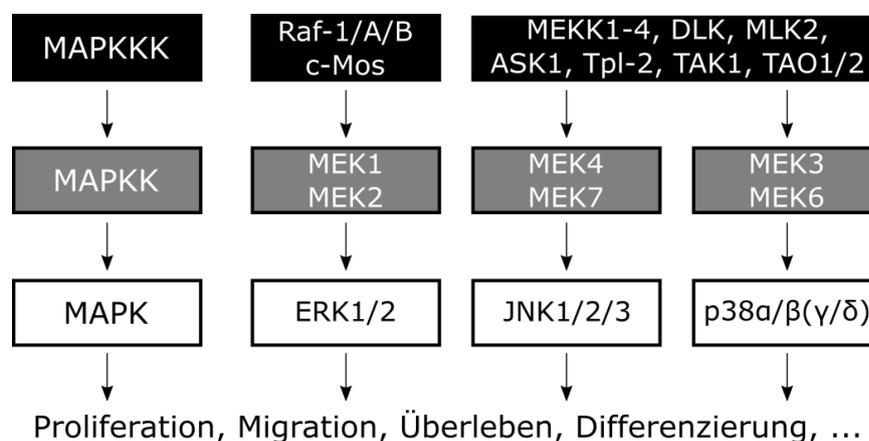
Als erstes Rac1-Effektorprotein wurde die Serin/Threonin-Kinase PAK (*p21-activated kinase*) beschrieben. Sie gehört zu den am besten charakterisierten Rac1-Effektoren. Die Aktivität von PAK ist unter nicht-stimulierten Bedingungen durch eine auto-inhibitorische Domäne

gehemmt, die die PAK-Kinase-Domäne blockiert. Die Bindung von aktivem Rac1 an PAK bewirkt eine Konformationsänderung, die die Kinase-Domäne freilegt [35]. Zusammen mit der Autophosphorylierung an T423 wird PAK vollständig aktiviert [36] und reguliert zum einen das Aktin-Zytoskelett (siehe 3.3.4) [37] und zum anderen den MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg (siehe 3.3.3.2) [38].

Die strukturellen Unterschiede in der Spleiß-Isoform Rac1b verhindern eine Bindung und Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase PAK, was in einer differenziellen Signaltransduktion resultiert [34].

### 3.3.3.2 MAPKs

MAPKs sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, die extrazelluläre Stimuli in eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse umwandelt. Darunter fallen unter anderem die Regulation der Proliferation, der Migration, des Überlebens und der Differenzierung [39]. Es sind 14 MAPKs bekannt, die sich in sieben Gruppen unterteilen lassen: ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), JNK1/2/3 (*c-jun N-terminal kinases 1/2/3*), p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$ , ERK5, ERK3/4, ERK7 und NLK (*Nemo-like kinase*) [39]. Diese MAPKs werden durch eine evolutionär stark konservierte Signaltransduktions-Kaskade aktiviert: Extrazelluläre Stimuli führen zur Aktivierung der MAPKKKs (MAP-Kinase-Kinase-Kinasen). Diese phosphorylieren und aktivieren die MAPKKs (MAP-Kinase-Kinasen), die dann die oben genannten MAPKs phosphorylieren und aktivieren (Abbildung 5).



**Abbildung 5 MAPK-Signaltransduktions-Kaskade.**

Verschiedene Stimuli aktivieren die MAPK-Signaltransduktions-Kaskade, die aus MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAPKKKs), MAP-Kinase-Kinasen (MAPKKs) und MAP-Kinasen (MAPKs) bestehen. Die Aktivierungskaskaden der drei konventionellen MAPKs ERK1/2, JNK1/2/3 und p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$  sind mit ihren entsprechenden, bekannten MAPKKKs und MAPKKs dargestellt.

Die Aktivierung von ERK1/2 spielt eine zentrale Rolle in der Proliferation. Dabei bewirkt aktives ERK1/2 die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk1 [40], was zur Transkription von *immediate early*-Genen führt. Darunter fällt beispielsweise *c-fos*, dessen Protein zusätzlich durch die ERK1/2-abhängige Phosphorylierung stabilisiert wird [41]. Zusammen mit *c-jun* bildet es den AP-1-Komplex, der die Cyclin D1-Expression induziert

[42]. Cyclin D1 ist ein zentraler Faktor, der durch die Bindung an Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) die G<sub>1</sub>/S-Transition bewirkt [39].

Verschiedene Stress-Stimuli, wie UV-Strahlung oder oxidativer Stress, sind für die Aktivierung der MAPK-Kaskade verantwortlich, die in einer Aktivierung der MAPKs JNK1/2/3 resultiert (Abbildung 5) [39]. JNK1/2/3 ist an der Regulation der Proliferation, Apoptose, Motilität, des Metabolismus und der DNA-Reparatur beteiligt [43].

Das am besten charakterisierte Substrat von JNK1/2/3 ist c-jun, welches mit c-fos am Aufbau des AP-1-Komplexes beteiligt ist und die Proliferation der Zellen steigern kann. Neben der pro-proliferativen Eigenschaft weist JNK auch pro-apoptische Funktionen auf. Durch den kombinierten Knockout von *jnk1* und *jnk2* in MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) wurde eine reduzierte Apoptose-Rate nach UV-Bestrahlung nachgewiesen [44].

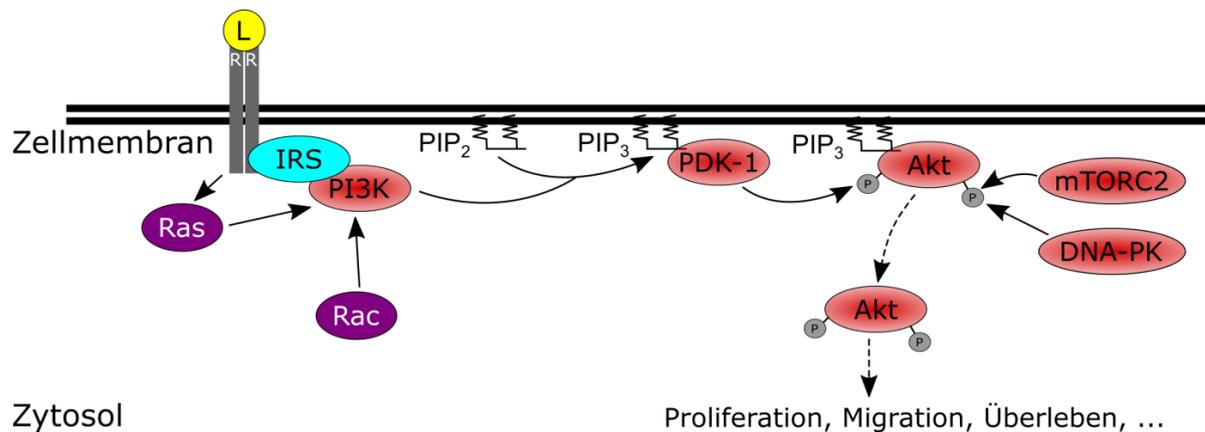
Die Rho-GTPase Rac1 ist ebenfalls in der Lage den JNK-Signalweg zu aktivieren [45, 46]. Dabei handelt es sich um einen PAK-unabhängigen Effekt, da die Expression von aktivem PAK keine gesteigerte Aktivierung von JNK bewirkt [47]. Stattdessen aktiviert Rac1 die Serin/Threonin-Kinase MLK3 (*mixed lineage kinase 3*), die eine SH3 (*Src homology 3*)- und eine CRIB (*Cdc42/Rac1 interactive binding*)-Domäne aufweist. Diese bewirkt dann die Aktivierung der MAPK-Kaskade, indem sie MEKK, eine MAPKKK, phosphoryliert und aktiviert [47].

Bei den MAPKs p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  handelt es sich wie bei JNK1/2/3 um Stress-induzierte Proteinkinasen. Sie werden daher unter anderem durch oxidativen Stress und TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) aktiviert [39, 48]. Die Bindung von TNF- $\alpha$  an seinen Rezeptor TNFR bewirkt die Rekrutierung des Adaptorproteins TRAF2 (*TNF receptor associated factor 2*). Daran können verschiedene MAPKKKs binden [48], die teilweise auch an der Aktivierung von JNK1/2/3 beteiligt sind. Dies deutet auf eine starke wechselseitige Beeinflussung des JNK- und p38-Signalweges hin (Abbildung 5) [48, 49].

Der p38-Signalweg ist insbesondere an der Regulation von Entzündungsreaktionen beteiligt, wobei es die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) fördert [50, 51]. Außerdem weist aktives p38 anti-proliferative Eigenschaften auf, indem es den Tumorsuppressor p53 aktiviert. Dies führt zur Transkription des CDK-Inhibitors p21<sup>CIP1</sup> und zu einer Inhibierung des Cdc2/Cyclin B-Komplexes, der für die G<sub>2</sub>/M-Transition erforderlich ist [39, 52].

### 3.3.3.3 PI3K/Akt

Unabhängig von den MAPK-Signalwegen kann Rac1 das Zellüberleben durch die Aktivierung des PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen)/Akt-Signalweges fördern [53, 54]. Dabei kann Rac1 direkt an die p85-Untereinheit der PI3K binden und sie so aktivieren [53, 55]. Aktive PI3K phosphoryliert bestimmte Membranproteine, die die Konvertierung von PIP<sub>2</sub>



**Abbildung 6 Schema des PI3K/Akt-Signalwegs.**

Die Bindung des Liganden (L) bewirkt die Aktivierung des spezifischen Rezeptors (R). Dadurch wird die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) einerseits durch Ras und andererseits direkt durch Rac aktiviert. Dies bewirkt die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-(3,4)-biphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP<sub>3</sub>). Dadurch kann Akt an die Zellmembran binden, wo es von PDK-1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) an T308 teilweise aktiviert wird. Die zusätzliche Phosphorylierung an S473 durch mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) oder durch DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) führt zur vollständigen Aktivierung von Akt und reguliert biologische Prozesse wie Proliferation, Migration und Überleben. IRS: *insulin receptor substrate*.

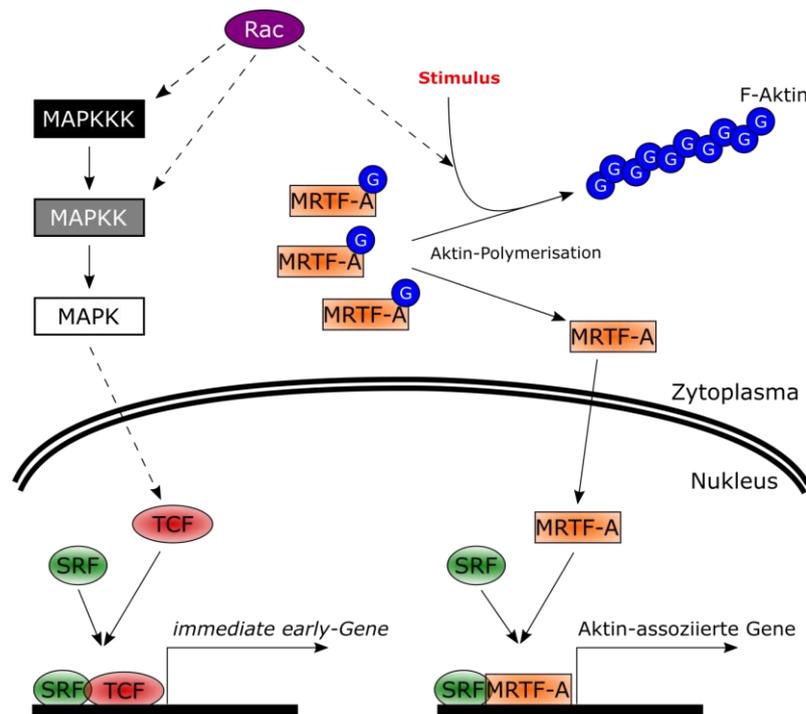
(Phosphatidylinositol-(3,4)-Bisphosphat) zu PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat) bewirken. Anschließend bindet Akt an der Plasmamembran an PIP<sub>3</sub>, woraufhin es von PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) an T308 und von mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) oder der DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) an S473 phosphoryliert wird. Erst durch die Phosphorylierung an diesen beiden Positionen wird Akt vollständig aktiviert und kann biologische Prozesse wie Migration, Proliferation und Zellüberleben steuern (Abbildung 6) [56].

Singh *et al.* wiesen eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch das ektope Einbringen der Rho-GTPase Rac1b in NIH3T3-Zellen nach. Damit aktiviert Rac1b zumindest in Fibroblasten selektiv einen Teil der Rac1-induzierten Signalwege [57].

### 3.3.3.4 SRF

Ein weiterer Signalweg, an dem Rac1 beteiligt ist, stellt der SRF (*serum response factor*)-Signalweg dar. SRF ist ein Transkriptionsfaktor, der je nach gebundenen Ko-Faktoren zwei unterschiedliche Gruppen von Zielgenen aktivieren kann. Dabei handelt es sich zum einen um *immediate early*-Gene [58, 59] und zum anderen um Gene, die Komponenten des Aktin-Zytoskeletts oder Aktin-bindende Proteine kodieren [59, 60].

Für die Induktion der *immediate early*-Gene bindet SRF an Ko-Faktoren der TCF (*ternary complex factor*)-Familie wie Elk-1, Sap-1 oder Net. Diese werden durch die Serum- oder Wachstumsfaktor-induzierte MAPK-Signaltransduktion aktiviert (Abbildung 7) und induzieren die Transkription von *immediate early*-Genen wie *c-fos* und *c-jun* [58].



**Abbildung 7 Aktivierung der SRF-abhängigen Genexpression.**

Der Transkriptionsfaktor SRF kann je nach gebundenen Ko-Aktivatoren die Expression zweier Gengruppen induzieren. Die Expression der *immediate early*-Gene wird durch die Bindung von SRF an Mitglieder der TCF-Familie (TCF) induziert, die durch die MAPK-Kaskade aktiviert werden. Die Expression der Aktin-assoziierten Gene erfolgt durch die Bindung von SRF an den Ko-Aktivator MRTF-A (*myocardin-related transcription factor A*). MRTF-A wird im inaktiven Zustand durch die Bindung an monomeres G-Aktin (G) im Zytosol zurückgehalten. Durch die Induktion der Aktinpolymerisation wird das MRTF-A freigesetzt und transloziert in den Nucleus. Die Rho-GTPase Rac nimmt auf beide Signalwege Einfluss, indem es zum einen die MAPKKs bzw. MAPKKs aktivieren kann und zum anderen in der Aktinpolymerisation eine wichtige Rolle spielt.

Die SRF-abhängige Transkription der Aktin-assoziierten Gene wird durch die Bindung der MRTF (*myocardin-related transcription factor*)-Familie unterstützt. Die Regulation der MRTFs wird durch das Aktin-*Treadmilling* reguliert. Dabei ist MRTF-A an monomeres, globuläres Aktin (G-Aktin) im Zytosol gebunden, was die Translokation in den Zellkern und somit die Transkription verhindert. Durch eine zunehmende Aktinpolymerisation wird der Pool an monomerem G-Aktin reduziert. Dadurch wird MRTF-A freigesetzt, transloziert in den Zellkern und aktiviert zusammen mit SRF die Gentranskription (Abbildung 7) [61-63]. Unter die Zielgene fallen beispielsweise *VCL* (Vinculin) und *ACTR3* (*actin-related protein 3*), dessen Genprodukt Teil des Arp2/3-Komplexes ist. Der Arp2/3-Komplex spielt an der Ausbildung von Lamellipodien an der richtungsweisenden Front migrierender Zellen eine wichtige Rolle, indem er eine Verzweigung des linearen Aktinfilaments und so die Bildung von Lamellipodien ermöglicht (siehe 3.3.4) [64]. Vinculin ist ein Bestandteil von Zell/Matrix-Kontakten und stabilisiert diese im Bereich der Lamellipodien, sodass sich die Zellen durch Kontraktion des Zellkörpers über das Substrat bewegen können [60].

Besonders die Aktin-abhängige Regulation der Genexpression wird durch die Aktivität von Rac1 reguliert, sodass unter anderem die Ausbildung von Lamellipodien ermöglicht wird (siehe Kapitel 3.3.4) [65].

### 3.3.4 Regulation des Aktin-Zytoskeletts

Die Effekte auf das Aktin-Zytoskelett sind für die Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 am besten charakterisiert, wobei sie für die Ausbildung von Stressfasern (RhoA), Filopodien (Cdc42) bzw. Lamellipodien (Rac1) verantwortlich sind [19].

Lamellipodien sind blattartige Strukturen mit einem verzweigten Aktinnetzwerk, deren Ausbildung durch die Rho-GTPase Rac1 reguliert wird. Diese Lamellipodien werden insbesondere in migrierenden Zellen an der richtungsweisenden Front ausgebildet [66]. Dabei bewirkt Rac1 mithilfe des Adapterproteins der WASP-Familie eine Aktivierung des Arp2/3-Komplexes und so die Ausbildung eines verzweigten Aktinnetzwerkes [64]. Durch diese verstärkte Aktinpolymerisation nimmt der G-Aktin-Pool in der Zelle ab, was, wie in 3.3.3 beschrieben, zu einer Freisetzung des SRF-Ko-Transkriptionsfaktors MRTF-A führt.

### 3.3.5 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

Eine Studie von Zhou *et al.* beschreibt eine Korrelation der Rac1-Expression mit der Induktion der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) in NSCLC-Patienten [12].

Bei der EMT handelt es sich um einen biologischen Prozess, bei dem epitheliale Zellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und stattdessen mesenchymale Charakteristika aufweisen. Dabei wird EMT in drei verschiedenen Situationen beobachtet und daher in drei Subtypen eingeteilt [67]: Die Typ I-EMT findet während der Implantation, der Embryogenese (Gastrulation, Bildung der Neuralleiste, Bildung der Herzklappen) und der Organentwicklung statt [68]. Die Typ II-EMT wird während der Wundheilung, der Gewebe-Regeneration und der Fibrose beobachtet. Das Ziel ist dabei die Reparatur des verletzten Gewebes. Die Typ III-EMT kommt in neoplastischen Zellen während der Tumorentwicklung und -metastasierung vor. Die Ursachen und Mechanismen sind dabei noch nicht vollständig verstanden und daher Gegenstand intensiver Forschung [67]. Die lokale Invasion wird jedoch als erster Schritt zur Dissemination eines Tumors angesehen.

Während der EMT sind verschiedene Veränderungen zu beobachten: Zum einen ändert sich die Zusammensetzung der Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakte. Die Zellen verlieren dabei ihre basal-apikale Polarität durch den Abbau der *Tight Junctions* [69, 70]. Außerdem werden E-Cadherin-vermittelte Zell/Zell-Kontakte durch die weniger stabilen N-Cadherin-vermittelten Zell/Zell-Kontakte ersetzt (sog. *Cadherin Switch*) [71, 72].

Zum anderen werden Änderungen im Zytoskelett beobachtet, bei der das kortikale Aktin zurück- und stattdessen Stressfasern ausgebildet werden [73, 74]. Außerdem werden Intermediärfilamente, die in epithelialen Zellen aus Cytokeratin zusammengesetzt sind, durch Vimentin ersetzt [75, 76].

Diese beiden Prozesse, Änderungen der Zellkontakte und des Zytoskeletts, können durch die typischen EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug, ZEB1/2 und Twist

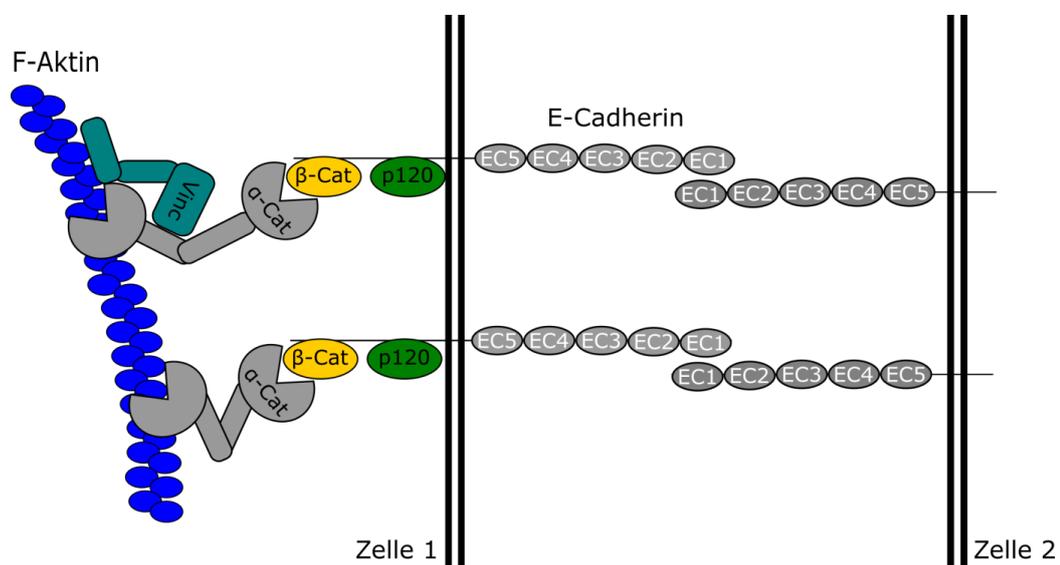
aktiviert werden und verursachen die beobachteten, phänotypischen Veränderungen während der EMT, bei der die Zellen einen spindelförmigen, mesenchymalen Phänotyp annehmen [77].

In der murinen Keratinozyten-Zelllinie PDV wurde sowohl durch die Behandlung der Zellen mit dem EMT-induzierenden Zytokin TGF $\beta$ 1 als auch durch konstitutiv-aktives Rac1(Q61L) eine Reduktion der E-Cadherin-Proteinmenge und eine Abnahme des kortikalen Aktins beobachtet [78]. Die Abnahme von E-Cadherin korrelierte mit einer Zunahme des EMT-induzierenden Transkriptionsfaktors Snail1, was darauf hindeutet, dass TGF $\beta$ 1 über Rac1 eine Induktion der EMT in Keratinozyten induzieren kann [78].

In NSCLC-Patienten wurde wie in der Keratinozyten-Zelllinie eine erhöhte Expression von Rac1 und Snail1 sowie eine reduzierte Expression von E-Cadherin beobachtet, wobei Rac1 mit einem höheren TNM-Status und einer erhöhten Metastasierungsrate einhergeht [12]. Aktives Rac1 könnte also auch in NSCLC-Tumoren an der Induktion einer EMT beteiligt sein.

### 3.3.6 E-Cadherin-vermittelte Zell/Zell-Kontakte

Während der EMT sind deutliche Veränderungen in den Zell/Zell-Kontakten zu beobachten. In epithelialen Zellen werden stabile Zell/Zell-Kontakte durch E-Cadherin-Komplexe ausgebildet. E-Cadherin ist ein Transmembranprotein, das aus einer extrazellulären, einer Transmembran- und einer intrazellulären Domäne besteht. Der extrazelluläre N-Terminus



**Abbildung 8 Aufbau eines E-Cadherin-vermittelten Zell/Zell-Kontaktes.**

Die extrazellulären Subdomäne EC1 der E-Cadherin-Moleküle zweier benachbarter Zellen interagieren miteinander und bilden so Zell/Zell-Kontakte aus. An die intrazelluläre Domäne binden verschiedene Catenin-Moleküle. p120-Catenin (p120) bindet an die Juxtamembran-Domäne und stabilisiert das E-Cadherin-Molekül. beta-Catenin (beta-Cat), das direkt an die intrazelluläre E-Cadherin-Domäne bindet, ist ein Adaptermolekül für alpha-Catenin (alpha-Cat), das wiederum direkt an F-Aktin (blau) binden kann und so den Zell/Zell-Kontakt stabilisiert. Die Ausübung von Zugkräften auf die F-Aktin-Fasern bewirkt eine Konformationsänderung von alpha-Catenin, was zur Freilegung einer Vinculin (Vinc)-Bindestelle führt. Vinculin kann so Zell/Zell-Kontakte stabilisieren, indem es sowohl an alpha-Catenin als auch an F-Aktin bindet.

kann in fünf extrazelluläre Subdomänen (EC1-EC5) unterteilt werden. Die EC1-Domäne interagiert  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig mit E-Cadherin-Molekülen benachbarter Zellen [79-81]. Die Bindung zweier E-Cadherin-Moleküle führt zur Rekrutierung weiterer E-Cadherin-Moleküle an diese Kontaktstelle, sodass ein E-Cadherin-Cluster ausgebildet wird, der sich lateral ausbreitet und zur Stabilisierung des Zell/Zell-Kontakts führt [79, 82]. Über die intrazelluläre, C-terminale Domäne des E-Cadherins werden die Zell/Zell-Kontakte durch die Bindung an das Aktin-Zytoskelett weiter stabilisiert [80, 82]. Daran sind mehrere Adapterproteine beteiligt, die hauptsächlich zur Familie der Catenine gehören.  $\alpha$ -Catenin bindet dabei mit seiner Aktin-Bindedomäne direkt an F-Aktin (filamentöses Aktin), was zur Bündelung der Aktinfasern führt [83, 84]. Der  $\alpha$ -Catenin/F-Aktin-Komplex ist über  $\beta$ -Catenin an die intrazelluläre Domäne des E-Cadherins gebunden [85].

p120-Catenin bindet direkt an die Juxtamembran-Domäne von E-Cadherin und verhindert so die Internalisierung und Degradation von E-Cadherin. Somit spielt p120-Catenin eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der E-Cadherin-Komplexe und damit der Zell/Zell-Kontakte [86, 87].

Beobachtungen von Ehrlich *et al.* in MDCK-Zellen (*Madin-Darby Canine Kidney*) zeigten eine membranäre Akkumulation von Rac1 an neu-gebildeten Zell/Zell-Kontakten, die sich zusammen mit den Zell/Zell-Kontakten lateral ausbreitete [88]. An den E-Cadherin-vermittelten Zell/Zell-Kontakten wurde Rac1 durch einen PI3K-abhängigen Signalweg aktiviert [89], wo es an sein Effektorprotein IQGAP binden kann. IQGAP ist ein Gerüstprotein, das an  $\beta$ -Catenin bindet und so die Ausbildung von stabilen, E-Cadherin-abhängigen Zell/Zell-Kontakten verhindert. An neuen Kontaktstellen bindet hingegen aktives Rac1 an IQGAP und bewirkt so die Stabilisierung der E-Cadherin-vermittelten Zell/Zell-Kontakte [90].

### 3.3.7 Integrin-vermittelte Zell/Matrix-Kontakte

Während der Zellmigration bildet die Zelle ständig neue Kontakte mit der extrazellulären Matrix (EZM) aus. Diese kurzzeitigen Zell/Matrix-Verbindungen werden als fokale Adhäsionen bezeichnet, die hauptsächlich über Integrin-Rezeptoren vermittelt werden. Integrin-Rezeptoren sind Heterodimere, die jeweils aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Dabei sind 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten beschrieben, die sich zu 24 verschiedenen Heterodimeren zusammenlagern (Tabelle 1) [91]. Sie bestehen aus einer großen extrazellulären Domäne, die für die Bindung der EZM-Proteine verantwortlich ist, einer Transmembrandomäne und einer kurzen intrazellulären Domäne (Ausnahme:  $\beta$ 4-Integrin), die über Adaptermoleküle an das Aktin-Zytoskelett bindet [92].

Die extrazelluläre Domäne kann in mehrere Subdomänen eingeteilt werden. Der globuläre, N-terminale Kopf der  $\alpha$ -Untereinheit ist wie ein gefalteter, sieben-blättriger  $\beta$ -Propeller aufgebaut, der auf einer Schenkel- und zwei Waden-Domänen steht. Diese Kopfdomäne des

**Tabelle 1 Einteilung der Integrin-Rezeptoren.**

Alle Integrin-Rezeptoren werden mit ihren Liganden in die vier Integrin-Rezeptor-Gruppen eingeteilt. Dabei werden dieselben Liganden von unterschiedlichen Integrin-Rezeptoren gebunden und einzelne Integrin-Rezeptoren können unterschiedliche Liganden binden. Kol: Kollagen. LN: Laminin. S1/S2: Spleißvariante 1/2. VCAM: *vascular cell adhesion molecule*. MadCAM: *mucosal addressin cell adhesion molecule*. VEGF: *vascular endothelial growth factor*. ICAM: *intercellular adhesion molecule*.

	Integrin-Rezeptor	Ligand(en)
RGD-bindende Rezeptor	$\alpha_5\beta_1$ (CD49e; VLA5)	Fibronektin
	$\alpha_8\beta_1$	Fibronektin; Vitronektin; Nephronektin
	$\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD41; GpIIb)	Fibrinogen; Fibronektin
	$\alpha_V\beta_1$ (CD51)	Fibronektin; Vitronektin
	$\alpha_V\beta_3$	Vitronektin; Fibronektin; Fibrinogen
	$\alpha_V\beta_5$	Vitronektin
	$\alpha_V\beta_6$	Vitronektin
	$\alpha_V\beta_8$	Vitronektin
Kollagen-Rezeptor	$\alpha_1\beta_1$ (CD49a; VLA1)	Kol IV > Kol I; Kol IX
	$\alpha_2\beta_1$ (CD49b; VLA2)	Kol I > Kol IV; Kol IX
	$\alpha_{10}\beta_1$	Kol IV > Kol VI > Kol II; Kol IX
	$\alpha_{11}\beta_1$	Kol I > Kol IV; Kol IX
Laminin-Rezeptor	$\alpha_3\beta_1$ (CD49c; VLA3)	LN-511 > LN-332 > LN-211
	$\alpha_6\beta_1$ (CD49f; VLA6)	LN-511 > LN332 > LN-111 > LN411
	$\alpha_6\beta_4$	LN-332; LN-511
	$\alpha_7\beta_1$	S1: LN-511 > LN-211 > LN-411 > LN111
Leukozyten-spez. Rezeptor	$\alpha_4\beta_1$ (CD49d; VLA4)	Fibronektin; VCAM-1
	$\alpha_4\beta_7$	MadCAM-1; Fibronektin; VCAM-1
	$\alpha_9\beta_1$	Tenascin-C; VEGF-C; VEGF-D
	$\alpha_D\beta_2$ (CD11d)	ICAM-3; VCAM-1
	$\alpha_E\beta_7$ (CD103; HML-1)	E-Cadherin
	$\alpha_L\beta_2$ (CD11a)	ICAM-1; ICAM-2; ICAM-3; ICAM-5
	$\alpha_M\beta_2$ (CD11b)	iC3b; Fibrinogen
	$\alpha_X\beta_2$ (CD11c)	iC3b; Fibrinogen

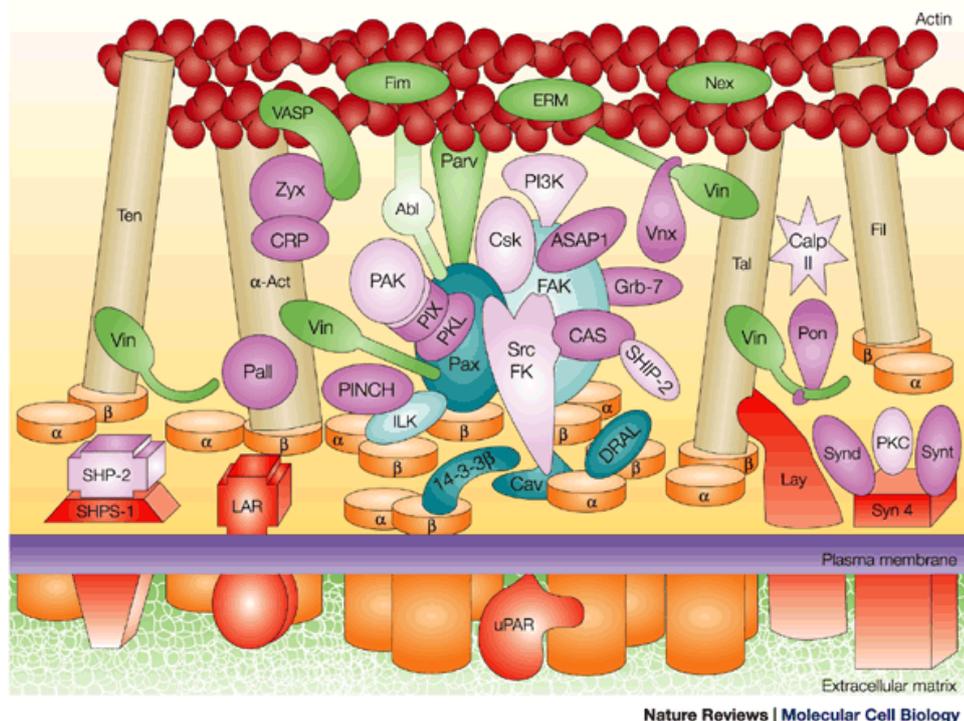
$\alpha$ -Integrins ist für die Ligandenbindung und -spezifität verantwortlich [93, 94]. Etwa die Hälfte aller  $\alpha$ -Integrine enthält zusätzlich eine weitere Subdomäne, die sogenannte I-Domäne (*inserted*; auch A-Domäne genannt). Sie befindet sich innerhalb der  $\beta$ -Propeller-Subdomäne und enthält eine konservierte Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS; *metal-ion-dependent adhesive site*). Durch die Bindung eines extrazellulären Liganden wird die Koordination des MIDAS-gebundenen  $Mg^{2+}$  verändert. Dies bewirkt eine Öffnung der I-Domänen-Konformation und die Steigerung der Liganden-Bindungsaffinität [95-97].

Die extrazelluläre Domäne der  $\beta$ -Untereinheit besteht aus einer Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI)-, einer Hybrid-, einer I-ähnlichen Domäne und vier Cystein-reichen EGF-Wiederholungen. Wie die I-Domäne der  $\alpha$ -Integrine enthält die I-ähnliche Domäne der  $\beta$ -Integrine eine MIDAS. Fehlt die I-Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit des Integrin-Rezeptors, so ist die  $\beta$ -Untereinheit mit ihrer I-ähnlichen Domäne für die Ligandenbindung verantwortlich [97, 98].

Integrin-Rezeptoren können entsprechend ihrer Liganden-Spezifität in vier Gruppen eingeteilt werden: die Kollagen-, die Laminin, die Leukozyten-spezifischen und die RGD-bindenden Rezeptoren. Die RGD-bindende Integrin-Rezeptoren erkennen das Tripeptid Arginin-Glyzin-Aspartat (RGD-Motiv), das in vielen EZM-Proteinen nachgewiesen wurde. Dazu gehören unter anderem Fibronectin, Vitronectin, Osteopontin, Thrombospondin sowie manche Kollagene (Tabelle 1) [92]. Über die Transmembrandomäne wird die Liganden-bindende, extrazelluläre Domäne mit der kurzen intrazellulären Domäne verbunden. Die intrazelluläre Domäne der  $\beta$ -Untereinheit ist für die Verankerung an das Aktin-Zytoskelett verantwortlich [99]. An dieser Verankerung wurden in verschiedenen Kombinationen mehr als 50 Adapterproteine nachgewiesen (Abbildung 9).

Eine kleine Gruppe dieser Adapterproteine bildet eine direkte Verbindung zwischen der intrazellulären Domäne der  $\beta$ -Integrin-Untereinheit und dem Aktin-Zytoskelett. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem Talin, Tensin,  $\alpha$ -Actinin und Filamin [100, 101]. Andere Integrin-assoziierten Moleküle können nur indirekt über andere Mitglieder des Adhäsionskomplexes an Aktinfasern binden und umgekehrt können Aktin-assoziierte Moleküle nur indirekt über weitere Adaptorproteine an den Integrinkomplex binden [101].

Durch die Cluster-Bildung der Integrine aufgrund der Liganden-Bindung werden neben den strukturellen Adapterproteinen zusätzlich Signaltransduktions-Moleküle an den Adhäsionskomplex rekrutiert [102], die in der Aktivierung verschiedener Integrin-abhängiger Signalwege resultiert und die Adhäsion, die Migration, das Überleben, das Wachstum und die Differenzierung beeinflussen [103]. Eines der ersten Signalmoleküle, die im Integrin-Adhäsionskomplex nachgewiesen wurden, ist die Proteinkinase FAK (*focal adhesion kinase*). Sie besteht aus einer N-terminalen FERM-Domäne (*protein 4.1, ezrin, radixin and moesin*



**Abbildung 9 Fokale Kontakte und damit assoziierte Proteine.**

Fokale Kontakte sind Zell/Matrix-Verbindungen, die durch Integrin-Rezeptoren (orange Zylinder in der EZM) vermittelt werden. Diese sind über verschiedene Adapterproteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden, was die fokalen Kontakte stabilisiert. Dabei bilden Adapterproteine eine direkte Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett (braun; Ten (Tensin),  $\alpha$ -Act ( $\alpha$ -Actinin), Tal (Talin), Fil (Filamin)) oder mehrere Adapterproteine sind in Reihe geschaltet (blau: Integrin-bindende Proteine, grün: Aktin-assoziierte Proteine). Außerdem sind in helleren Farben Proteine dargestellt, die an der Integrin-abhängigen Signaltransduktion beteiligt sind: Src FK (Src Kinasen), CSK (C-terminale Src-Kinase), PKC (Proteinkinase C). Diese Abbildung wurde mit der Genehmigung des Verlages von Geiger *et al.* übernommen [101].

*homology*-Domäne), einer zentralen Kinase-Domäne und einer C-terminalen Domäne, die die FAT (*focal adhesion targeting*)-Sequenz enthält. Im inaktiven Zustand ist die Kinase-Domäne direkt durch die FERM-Domäne blockiert [104]. Die Bindung von FAK an die intrazelluläre Domäne der  $\beta$ -Integrin-Untereinheit bewirkt eine Konformationsänderung der FERM-Domäne, was die Freilegung der Kinase-Domäne und der Auto-Phosphorylierungsstelle Y397 bewirkt. An dieses auto-phosphorylierte Tyrosin können nun weitere Proteine, wie Mitglieder der Src-Familie oder die p85-Untereinheit der PI3K binden [103, 104]. Die C-terminale Domäne von FAK enthält weitere Protein/Protein-Bindestellen, wodurch FAK an der Regulation der Migration und der Invasion beteiligt [105, 106].

Ein zentrales Protein des Adhäsionskomplexes, Paxillin, bindet ebenfalls an FAK. Das Paxillin-Protein ist durch viele Protein/Protein-Bindestellen (SH2- und SH3-Domänen-Bindestellen, LIM-Domänen, LD-Motive) sowie durch zusätzliche Phosphorylierungsstellen charakterisiert, die weitere Protein/Protein-Bindestellen darstellen können [107]. Durch die große Anzahl an Protein/Protein-Bindungsstellen vermittelt das Adaptermolekül Paxillin die Bindung an Kinasen (z. B. FAK, Src), an Phosphatasen (z. B. PTP-PEST (*protein tyrosine phosphatase*-PEST)), an Aktivatoren der Familie der Rho-GTPasen (CrkII-DOCK180-ELMO-Komplex, PIX) und an Aktin-bindende Proteine (z. B. Vinculin, Parvin).

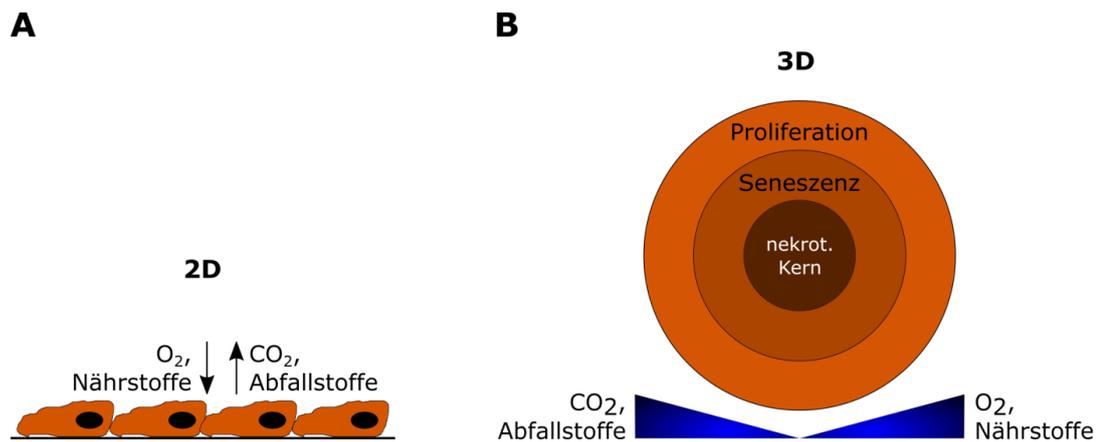
Vinculin wurde als erster Bindungspartner von Paxillin identifiziert, der das Aktin-Zytoskelett mit den fokalen Adhäsionen verbindet [108]. Dabei wurden für das Vinculin-Protein neben der Paxillin-Bindestelle weitere Interaktionsstellen mit Talin und Aktin nachgewiesen [109]. Somit nimmt Vinculin neben seiner Funktion in E-Cadherin-vermittelten Zell/Zell-Kontakten auch eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der fokalen Kontakte ein.

### **3.4 3D-Zellkultur**

#### **3.4.1 Unterschiede zwischen der 2D- und 3D-Zellkultur**

Bei dem wohl am häufigsten angewandten Modell zur Untersuchung der zellulären Eigenschaften und Verhaltensweisen handelt es sich um die 2-dimensionale (2D) Zellkultur. Sie wurde das erste Mal im Jahr 1907 zur Untersuchung von Nervenfasern von Harrison *et al.* verwendet [110]. Seitdem wurde die Methode stetig verbessert, sodass biologische Prozesse in diesem System unter einheitlichen Bedingungen untersucht werden können. Bei der 2D-Zellkultur wachsen adhärente Zellen als Monolayer auf einer Plastik- oder Glas-Oberfläche. Über verschiedene Zellkulturmedien werden die Zellen mit Wachstumsfaktoren und Nährstoffen versorgt und können mithilfe verschiedener Faktoren direkt manipuliert werden. Diese sind für alle Zellen gleichermaßen zugänglich, was in einem homogenen Wachstums- und Proliferationsverhalten der Zellen resultiert (Abbildung 10A) [111]. Durch die Anwendung dieser Standard-Kultivierungsmethode wurde über viele Jahre hinweg eine Vielzahl an Daten generiert, die zum heutigen Verständnis der zellulären Prozesse einen großen Beitrag leistete. Dadurch wird eine gute Vergleichbarkeit und die Einordnung der Daten in einen fachwissenschaftlichen Kontext ermöglicht. Bei der 2D-Zellkultur handelt es sich also um eine einfache, Kosten- und Zeit-effiziente Methode um Zellen zu beobachten, zu manipulieren und zu analysieren [112, 113].

Dennoch spiegelt diese Kultivierungsart nicht die Bedingungen humaner Gewebe und Tumore wider, bei der verschiedene Zellarten, die EZM und weitere Faktoren miteinander interagieren [112, 113]. Humane Gewebe und Tumore sind 3-dimensional aufgebaut, wobei die Zellen in eine EZM eingebettet sind bzw. auf einer Basalmembran wachsen und mit dieser und untereinander interagieren. Dadurch werden viele zelluläre Prozesse wie beispielsweise die Differenzierung, Proliferation und Migration reguliert [113, 114]. Um die Situation im Tumor besser nachstellen zu können, wurden verschiedene Kultivierungsmethoden entwickelt, bei denen die Zellen innerhalb und außerhalb einer EZM 3-dimensionale Strukturen ausbilden können (siehe 3.4.2). Durch die Verwendung dieser 3D-Kultivierungsmethoden wurden Zell-Cluster generiert, die aufgrund ihrer 3-Dimensionalität einen Nährstoff- und Sauerstoff-Gradienten ausbilden. Da nur die äußeren Zellschichten mittels Diffusion mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden können, gibt es zum Zentrum hin einen stark abnehmenden Gradienten.



**Abbildung 10 Schematischer Vergleich der 2D- und 3D-Kultivierung.**

**[A]** Bei der 2D-Zellkultur wachsen die Zellen als Monolayer auf einer Glas- oder Plastik-Oberfläche und sind mit Zellkulturmedium überschichtet. Dabei werden alle Zellen homogen mit Sauerstoff ( $O_2$ ) und Nährstoffen versorgt, während Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) und Abfallstoffe direkt an das Zellkulturmedium abgegeben werden können. **[B]** Bei der 3D-Zellkultur steht nur die äußere Zellschicht in direktem Kontakt mit dem Zellkulturmedium. Der Sauerstoff und die Nährstoffe können nur durch Diffusion ins Innere des Zell-Clusters gelangen, weswegen ein zum Zentrum abnehmender Gradient entsteht. Außerdem akkumulieren dadurch Kohlenstoffdioxid und Abfallstoffe im Zentrum des Zell-Clusters. Aufgrund dieser Gradienten entstehen innerhalb des Zell-Clusters verschiedene Proliferationszonen. In der Peripherie ist eine hohe Proliferationsrate nachweisbar, die über einen seneszenten Bereich in einen nekrotischen Kern übergehen kann.

Gleichzeitig akkumulieren die im Zentrum der Zell-Cluster gebildeten Abfallprodukte und das produzierte Kohlenstoffdioxid, sodass weitere Gradienten entstehen, die zur Peripherie hin abnehmen (Abbildung 10B) [115]. Unter anderem sind diese Gradienten für die Ausbildung verschiedener Proliferationszonen innerhalb eines Zell-Clusters verantwortlich: Im Zentrum findet oft aufgrund der schlechten Nährstoff- und Sauerstoff-Versorgung wenig Proliferation statt. Bei Zell-Clustern mit einem größeren Durchmesser (ab ca. 500-600  $\mu m$ ) kann häufig ein nekrotischer Kern nachgewiesen werden. Die Nährstoff- und Sauerstoff-Versorgung in den äußeren Zellschichten ist hingegen kontinuierlich gewährleistet, was in einer hohen Proliferationsrate resultiert (Abbildung 10B) [115, 116].

### 3.4.2 3D-Kultivierungsmethoden

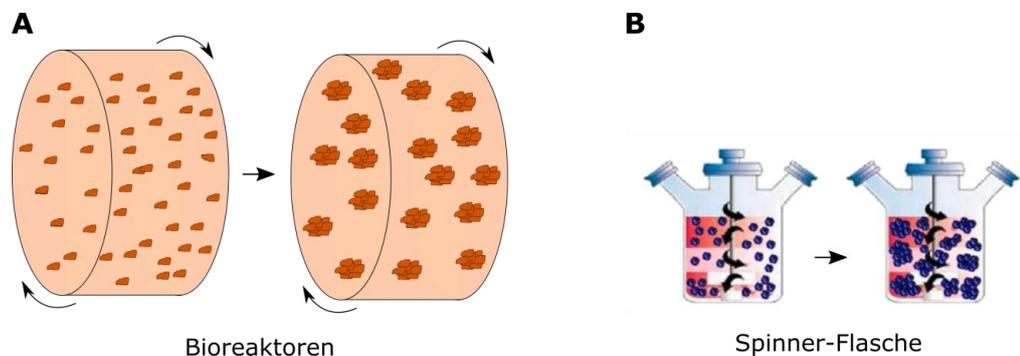
Bei den 3D-Kultivierungsmethoden kann man zwei grundlegende Methoden unterscheiden, bei der die Zellen entweder ohne oder mit einer Trägerstruktur kultiviert werden.

Bei der 3D-Kultivierung ohne eine Trägerstruktur wird die Adhäsion der Zellen an Oberflächen mit unterschiedlichen Methoden verhindert und die normalerweise adhären Zellen werden in Suspension kultiviert. Dabei bilden die Einzelzellen untereinander Zell/Zell-Kontakte und schließlich 3-dimensionale Zellverbände aus (siehe 3.4.2.1, 3.4.2.2, 3.4.2.3, 3.4.2.4) [117].

Für die 3D-Kultivierung mit einer Trägerstruktur werden die Zellen in eine Hydrogelmatrix eingebettet, wo sie neben Zell/Zell-Kontakten zusätzlich Zell/Matrix-Kontakte ausbilden können (siehe 3.4.2.5) [117, 118].

### 3.4.2.1 Die Suspensions-Kultur

Bei dieser Methode werden die Zellen in Bioreaktoren durch ständige Bewegung des Zellkulturmediums an der Oberflächenadhäsion gehindert. Bei einer kleineren Variante der Bioreaktoren handelt es sich um die sog. Spinner-Flasche (Abbildung 11A, B) [119, 120].



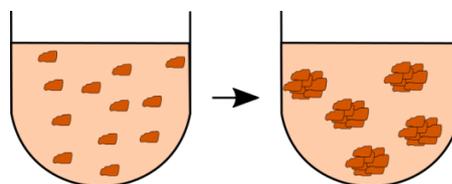
**Abbildung 11 Schematische Darstellung der Bioreaktoren und der Spinner-Flaschen.**

**[A]** In Bioreaktoren werden die Zellen als Einzelzell-Suspension ausgesät. Durch das ständige Rotieren des Bioreaktors um die eigene Achse wird ein Adhärenz der Zellen verhindert. Im Laufe der Zeit bilden sie durch Zell/Zell-Kontakte kompakte Sphäroide aus. **[B]** Spinner-Flaschen sind kleine Bioreaktoren, bei denen ein rotierendes Element die Zellen in Bewegung hält. Die schematische Darstellung wurde mit Genehmigung des Verlages aus Hoarau-Véchet *et al.* entnommen [117].

Bei dieser 3D-Kultivierungsmethode bilden sich 3-dimensionale Sphäroide mit einem relativ einheitlichen Durchmesser aus und die ständige Bewegung gewährleistet eine gute Nährstoff- und Sauerstoff-Versorgung [121].

### 3.4.2.2 Spontane Sphäroid-Bildung

Bei dieser Methode wird die Oberflächenadhäsion der Zellen durch die Beschichtung der Plastikoberfläche mit Agar oder poly-HEMA (poly-2-Hydroxyethyl-methacrylat) verhindert (Abbildung 12) [122, 123]. Der Vorteil dieser Methode ist die einfache Durchführung und die hohe Reproduzierbarkeit der Sphäroide hinsichtlich ihrer Größe, die durch die Erhöhung oder Reduktion der eingesetzten Zellkonzentrationen angepasst werden kann [123].



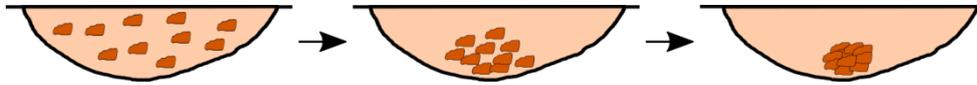
**Abbildung 12 Schematische Darstellung der spontanen Sphäroid-Bildung.**

Die Einzelzell-Suspension wird in Zellkulturgefäße ausgesät, die durch eine Agar- bzw. poly-HEMA-Beschichtung die Adhäsion der Zellen verhindern. Die Zellen bilden über Zell/Zell-Kontakte kompakte Sphäroide aus.

### 3.4.2.3 Hanging Drop-Methode

Bei der *Hanging Drop*-Methode wird die Zellsuspension auf die Unterseite eines Petrischalen-Deckels pipettiert. Nach dem Umdrehen akkumulieren die Zellen durch die Gravitation an der Spitze des Tropfens, wo sie Sphäroide ausbilden können. Mit dieser

Methode können Sphäroide hinsichtlich ihrer Größe, Zellzahl und Zusammensetzung reproduzierbar hergestellt werden (Abbildung 13). Obwohl die Durchführung der *Hanging Drop*-Methode einfach ist und keine spezielle Ausrüstung benötigt wird, ist der Zeit- und Materialaufwand überdurchschnittlich hoch [124].

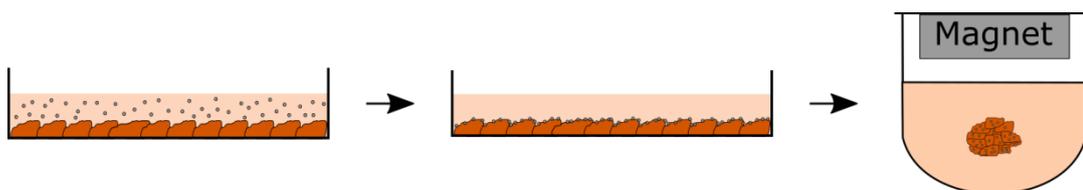


**Abbildung 13 Schematische Darstellung der *Hanging Drop*-Methode.**

Ein Tropfen der Einzelzellsuspension wird auf den Deckel einer Petrischale pipettiert und umgedreht. Durch die Schwerkraft sammeln sich die Zellen an der Spitze des Tropfens und bilden über Zell/Zell-Kontakte ein kompaktes Zellsphäroid pro Tropfen aus.

#### 3.4.2.4 Magnetische Levitation

Mit der zellulären Aufnahme von magnetischem Eisenoxid und dem Anlegen eines magnetischen Feldes entwickelten Souza *et al.* die magnetische Levitation als weitere 3D-Kultivierungsmethode (Abbildung 14) [125]. Durch die Aggregation der Zellen werden nicht nur Zell/Zell-Kontakte ausgebildet, Tseng *et al.* wies zusätzlich die Sekretion einer EZM durch die 3D-kultivierten Zellen nach [126].



**Abbildung 14 Schematische Darstellung der magnetischen Levitation.**

Zellen, die als Monolayer kultiviert wurden, nehmen die magnetischen Eisenoxid-Nanopartikel (graue Kugeln) auf. Durch Aussaat der magnetisierten Zellen und das Anlegen eines magnetischen Feldes werden kompakte Sphäroide generiert.

Bei der magnetischen Levitation handelt es sich um eine 3D-Kultivierungsmethode, die Sphäroide mit einem Durchmesser im Millimeterbereich generieren kann, wodurch unter Umständen ein nekrotischer und hypoxischer Kern ausgebildet werden kann [117].

Nachteile dieser Methode stellen die benötigten Eisenoxid-Nanopartikel dar, die teuer sind und bei zu hohen Konzentrationen auf die Zellen toxisch wirken können [117].

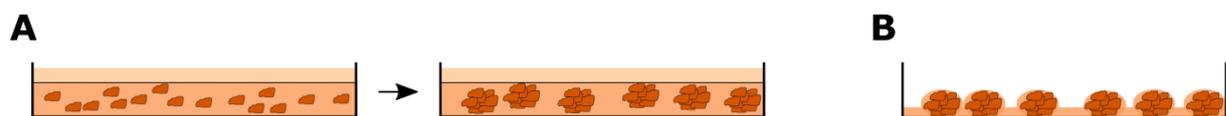
#### 3.4.2.5 Hydrogel-basierte 3D-Kultivierung

Bei der Hydrogel-basierten 3D-Kultivierung handelt es sich um eine 3D-Kultivierungsmethode innerhalb einer Trägerstruktur, mit der neben den Zell/Zell-Kontakten auch die Zell/Matrix-Kontakte analysiert werden können [117, 118]. Sie wurde das erste Mal von Elsdale & Bard im Jahre 1972 beschrieben [127]. Dabei werden die Zellen entweder als Sphäroide oder als Einzelzellsuspension in die Hydrogelmatrix eingebettet, die die EZM nachstellen soll (Abbildung 15A).

Es können biologische und synthetische Hydrogelmatrixen unterschieden werden [117]:

Bei den biologischen Hydrogelmatrices handelt es sich beispielsweise um Matrigel oder Kollagene. Matrigel wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Maussarkom isoliert. Das EHS-Sarkom ist ein Tumor, der durch einen großen Anteil an EZM charakterisiert ist. Dabei sind neben den beiden Hauptkomponenten Laminin und Kollagen IV auch Heparansulfat-Proteoglykane, Nidogen und verschiedene Wachstumsfaktoren enthalten. Diese Komponenten entsprechen im Wesentlichen der Zusammensetzung der Basalmembran [128]. Durch die 3D-Kultivierung in einer Matrigelmatrix kann sowohl für primäre Zellen als auch für etablierte Zelllinien eine Differenzierung beobachtet werden, die sich durch die Ausbildung tubulärer Strukturen oder durch die Sekretion spezieller Faktoren auszeichnet [128-130].

Humanes Bindegewebe besteht hauptsächlich aus Kollagen I, weswegen dieses Molekül häufig für dessen Modellierung verwendet wird. Dabei können unterschiedliche Kollagen I-Konzentrationen eingesetzt werden, die die Steifheit der Matrix und somit das Verhalten der Zellen innerhalb dieser Matrix stark beeinflussen können [131].



**Abbildung 15 Schematische Darstellung der Hydrogel-basierten 3D-Kultivierung.**

**[A]** Die Zellen werden als Einzelzell-Suspension in einer Hydrogelmatrix ausgesät, in der sie dann Zell-Cluster ausbilden. **[B]** Eine Variante der Hydrogel-basierten 3D-Kultivierung ist die „3D on-top“-Kultivierung. Dabei werden die Zellen auf einer Hydrogel-beschichteten Platte ausgesät und mit einer dünnen Hydrogelschicht überschichtet.

Das Labor von M. Bissell entwickelte neben der typischen Hydrogel-basierten 3D-Kultivierung die sog. „3D on-top“-Kultivierung. Dabei werden die Zellen auf einer dünnen Schicht einer Hydrogelmatrix ausgesät und mit einer weiteren dünnen Hydrogelmatrix-Schicht überzogen (Abbildung 15B) [132]. Diese Methode ermöglicht eine vereinfachte Beobachtung und Analyse der Zellen unter dem Mikroskop, da alle Zellen in einer Fokusebene wachsen [132]. Des Weiteren wird für diese Kultivierungsmethode deutlich weniger Hydrogelmatrix benötigt, was die Dauer der Zellisolation verkürzt.

Bei den Hydrogel-basierten 3D-Kultivierungsmethoden handelt es sich um die einzigen Methoden, mit der intensiv Zell/Matrix-Interaktionen untersucht werden können. Gleichzeitig wird dabei eine natürliche Umgebung imitiert, bei der die mechanischen und strukturellen Eigenschaften sowie die Zusammensetzung der Situation im Tumor entsprechen [117].

## 4 Zielsetzung

Die Rho-GTPase Rac1 und seine Spleißvariante Rac1b sind in humanen Lungentumoren überexprimiert und korrelieren mit einer erhöhten Aggressivität der Tumore [12, 15]. Diese Beobachtungen weisen auf eine onkogene Rolle der beiden Rac-Isoformen hin. Biochemische Analysen zeigten, dass Rac1 hauptsächlich in seiner inaktiven, GDP-gebundenen Form vorliegt und durch entsprechende Stimuli aktiviert werden kann [17]. Rac1b liegt hingegen vorwiegend in seiner aktiven, GTP-gebundenen Form vor und weist damit konstitutiv-aktive Eigenschaften auf [34]. Bisher ist jedoch wenig über den molekularen Wirkungsmechanismus von Rac1b bekannt und es wurden kaum Rac1b-spezifische Effekte in der Tumorigenese identifiziert. Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen, die der tumorigenen Funktion von Rac1b zugrunde liegen, zu identifizieren. Hierfür wurden H23-Zellen analysiert, die transient bzw. stabil Rac1 oder Rac1b exprimierten und Tumor-relevante Prozesse wie Proliferation, Migration und die epitheliale Differenzierung untersucht. Dabei sollten die tumorigenen Effekte von Rac1b im Vergleich zu denen von Rac1 analysiert werden. Weiterhin sollte auf zellulärer Ebene die mögliche genregulatorische Fähigkeit von Rac1b in NSCLC untersucht werden. Daher sollten diverse Promotorkonstrukte auf eine Rac1b-induzierbare Aktivierung untersucht werden. Darunter fallen sowohl bekannte Rac1-induzierbare als auch weitere Promotorkonstrukte, die mögliche Rac1b-spezifische Funktionen identifizieren sollen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung der 3D-Kultivierung der NSCLC-Zelllinien H358 und H23. Die 3D-Kultivierung soll die zellulären Vorgänge in humanen Tumoren besser nachvollziehen als die 2D-Kultivierung. In dieser Arbeit sollen vergleichende Analysen der Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakte sowie der Genexpression zwischen 2D- und 3D-kultivierten H358- und H23-Zellen durchgeführt werden. Durch die Verwendung verschiedener 3D-Kultivierungsmethoden, die sich hinsichtlich ihrer Komplexität unterscheiden, können dadurch einerseits 3D-induzierte Effekte identifiziert und andererseits der Einfluss der EZM charakterisiert werden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Humane Zelllinien

**Tabelle 2** Verwendete eukaryotische Zelllinien.  
ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, USA

Zelllinie	Gewebe- / Tumorart	K-Ras Status	ATCC-Nummer
HEK293	Embryonale Nierenzellen		ATCC® CRL-1573™
H23	NSCLC, Lungenadenokarzinom	K-Ras(G12C), heterozygot	ATCC® CRL-5800™
H358	NSCLC, Bronchio-alveoläres Karzinom	K-Ras(G12C), heterozygot	ATCC® CRL-5807™

#### 5.1.2 Escherichia coli-Stämme

TOP10f *E.coli*

Invitrogen, Karlsruhe

#### 5.1.3 RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array

RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array „Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules“

PAHS-013ZA-6, Qiagen, Hilden

#### 5.1.4 Primer

Die folgenden Primer wurden für qRT-PCR eingesetzt. Die Sequenzen wurden selbst bestimmt und die PCR-Bedingungen optimiert. Jede Reaktion enthielt 2,5 µM pro Primer. Die Annealing-Temperatur aller Primer beträgt 55 °C und die Elongationsdauer beträgt für alle folgenden Primerpaare 1 min.

**Tabelle 3** Sequenzen der verwendeten qRT-PCR-Primer.

Primer-Name	Sequenz (5' --> 3')
CTNNB1_fw	TGAGACATTAGATGAGGGCA
CTNNB1_rev	AAGGTTATGCAAGGTCCCAG
PYK2_fw	GAAGTCCGATGAGATCCACTG
PYK2_rev	CTTCTGGCAAGTAGCGGATTT
TWIST1_fw	GGAGTCCGCAGTCTTACGAG
TWIST1_rev	TCTGGAGGACCTGGTAGAGG

Bei den folgenden QuantiTect Primer Assays von Qiagen (Hilden) handelt es sich um bioinformatisch-validierte Primersets, die für SYBR green-basierte qRT-PCRs eingesetzt

werden. Die Annealing-Temperatur beträgt laut Herstellerangabe für alle Primer 55 °C und die Elongationsdauer beträgt pro Primer Assay 30 sec.

**Tabelle 4** Verwendete QuantiTect Primer Assays für qRT-PCR.

<b>Gen</b>	<b>Produktname</b>	<b>Katalog-Nummer</b>
<b>CDH1</b>	Hs_CDH1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00080143
<b>COL6A1</b>	Hs_Col6a1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00084343
<b>COL7A1</b>	Hs_Col7a1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00998886
<b>COL12A1</b>	Hs_Col12a1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00017206
<b>COL15A1</b>	Hs_Col15a1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00217392
<b>COL16A1</b>	Hs_Col16a1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00057435
<b>CTGF</b>	Hs_CTGF_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00052899
<b>CTNND1</b>	Hs_CTNND1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00033831
<b>FN1</b>	Hs_FN1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00038024
<b>GAPDH</b>	Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00079247
<b>ITGA2</b>	Hs_ITGA2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00086695
<b>ITGA4</b>	Hs_ITGA4_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00060627
<b>ITGA5</b>	Hs_ITGA5_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00080871
<b>ITGB4</b>	Hs_ITGB4_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00049147
<b>MMP1</b>	Hs_MMP1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00014581
<b>MMP13</b>	Hs_MMP13_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00001764
<b>NCAM1</b>	Hs_NCAM1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00071211
<b>SLUG</b>	Hs_SNAI2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00044128
<b>SNAIL</b>	Hs_SNAI1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00010010
<b>SPARC</b>	Hs_SPARC_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00018620
<b>TGFBI</b>	Hs_TGFBI_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT01009477
<b>ZEB1</b>	Hs_ZEB1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00020972
<b>ZEB2</b>	Hs_ZEB2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00008554

### 5.1.5 Plasmide

Für die Herstellung der transient und stabil EGFP-, EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden HEK293- bzw. H23-Zellen wurden die Zellen mit folgenden Plasmiden transfiziert. Sie enthalten eine G418-Antibiotika-Resistenz, mit der die Zellen selektioniert wurden.

Tabelle 5 Verwendete Plasmide für die ektope Expression der Rac-Isoformen.

Plasmid	Herkunft
pCGN/HA	Addgene, Watertown, USA [133]
pCGN/HA-Rac1 WT	AG Giehl, Gießen
pCGN/HA-Rac1b WT	AG Giehl, Gießen
pEGFP N1	Clontech, Heidelberg
pEGFP/Rac1 WT	AG Menke / AG Giehl, Gießen
pEGFP/Rac1b WT	AG Menke / AG Giehl, Gießen
pCGN/HA-Rac1(G12V)	AG Menke / AG Giehl, Gießen
pCGN/HA-Rac1b(G12V)	AG Menke / AG Giehl, Gießen

Die folgenden Plasmide wurden in den Genreporter-Assays verwendet:

Tabelle 6 In dieser Arbeit verwendete Plasmide für Genreporter-Assays.

Plasmid	Reporter-konstrukt	Herkunft
pRLTK	-	Promega, Mannheim
p3TP-lux	Ja	Prof. Massagué, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York
pGL/AP1	Ja	AG Menke / AG Giehl, Gießen
pGL3/c-Myc	Ja	AG Menke / AG Giehl, Gießen
pGL/Cyclin D1	Ja	AG Menke / AG Giehl, Gießen
pGL3/E-Cadherin	Ja	Prof. Park, University of Montreal
pGL3/Ets2	Ja	Addgene, Watertown, USA
pGL3/Ets-AP-1	Ja	Prof. Hollenhorst, Indiana University, USA
pGL3/N-Cadherin	Ja	AG Menke / AG Giehl, Gießen
pGL3/NFAT	Ja	AG Menke / AG Giehl, Gießen
pGL3/NFκB	Ja	AG Menke / AG Giehl, Gießen
pGL/SRE.L	Ja	Prof. Posern, Universität Halle
pGL3/TOPflash	Ja	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
pGL/XFN	Ja	Dr. Wedlich, Universität Karlsruhe

### 5.1.6 Primär-Antikörper

**Tabelle 7** Verwendete Primär-Antikörper.

MG: Molekulargewicht; WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenz; pk: polyklonal; mk: monoklonal; Abcam (Berlin); Acris: Acris Antibodies GmbH (Herford); BD: BD Biosciences (Heidelberg); Bio-Rad: Bio-Rad AbD Serotec GmbH (Puchheim); CST: Cell Signaling (Frankfurt a. M.); Dianova (Hamburg); Millipore: Merck Millipore (Darmstadt); Roche: Roche Diagnostics (Mannheim); Santa Cruz: Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg); Sigma-Aldrich (Taufkirchen); Thermo: Thermo Fisher Scientific (Langenselbold).

Antigen	Ursprung	Verdü- nung	WB/ IF	Klon	Hersteller und Artikelnummer	MG [kDa]
<b>(pan-)Akt</b>	Maus (mk)	1:1000	WB	40D4	CST, #2920	60
<b>P-Akt</b> <sup>S473</sup>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		CST, #9271	60
<b>β-Aktin</b>	Maus (mk)	1:4000	WB	AC-15	Sigma-Aldrich, A5441	42
<b>Arp2</b>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		CST, #3128	44
<b>E-Cadherin</b>	Kaninchen (mk)	1:5000	WB	EP700Y	Abcam, ab40772	120
<b>N-Cadherin</b>	Maus (mk)	1:2000	WB	Clone 32	BD, 610920	130
<b>α-Catenin</b>	Kaninchen (pk)	1:5000	WB		Sigma-Aldrich, C2081	102
<b>β-Catenin</b>	Maus (mk)	1:2000	WB	Clone 14	BD, 610154	94
<b>β-Catenin</b>	Kaninchen (pk)	1:500	IF		Sigma-Aldrich, C2206	94
<b>γ-Catenin</b>	Maus (mk)	1:4000	WB	Clone 15	BD, 610253	86
<b>p120-Catenin</b>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		Santa Cruz, sc-1101	90- 120
<b>Caveolin</b>	Kaninchen (pk)	1:3000	WB		BD, 610059	21
<b>Cofilin</b>	Maus (mk)	1:1000	WB	Clone 32	BD, 612144	19
<b>P-Cofilin</b> <sup>S3</sup>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		CST, #3311	19
<b>ERK1/2</b>	Maus (mk)	1:2000	WB	L34F12	CST, #4696	42/44
<b>P-ERK1/2</b> <sup>T202/Y204</sup>	Kaninchen (mk)	1:1000	WB	XP D13.14.4E	CST, #4370	42/44
<b>Ezrin</b>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		CST, #3145	81
<b>FAK</b>	Maus (mk)	1:1000	WB	Clone 77	BD, 610088	125

Antigen	Ursprung	Verdü- nung	WB/ IF	Klon	Hersteller und Artikelnummer	MG [kDa]
<b>GAPDH</b>	Maus (mk)	1:5000	WB	6C5	Acris, ACR001P	36
<b>GAPDH</b>	Kaninchen (pk)	1:5000	WB		Rockland, 600-401-A33	36
<b>GFP</b>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		Santa Cruz, sc-8334	27
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Maus (mk)	1:1000	WB	3D10	CST, #9832	46
<b>P-GSK3<math>\alpha/\beta</math><sup>S21/S9</sup></b>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		CST, #9331	46/51
<b>HA</b>	Maus (mk)	1:1000	WB	12CA5	Roche, 1583816	1
<b>Integrin <math>\alpha_1</math></b>	Maus (mk)	1:500	WB	TS2/7	Bio-Rad, MCA1133	130
<b>Integrin <math>\alpha_2</math></b>	Kaninchen (pk)	1:500	WB		Millipore, MAB1936	160
<b>Integrin <math>\beta_1</math></b>	Maus (mk)	1:1000	WB	JB1A	Millipore, MAB1965	130
<b>JNK1/2</b>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		Santa Cruz, sc-571	46/55
<b>P-JNK1/2<sup>T183/Y185</sup></b>	Maus (mk)	1:1000	WB	Clone 41	BD, 612541	46/55
<b>Ki67</b>	Maus (mk)	1:200	IF	MIB1	Dianova, DIA-505	359
<b>p38</b>	Maus (mk)	1:1000	WB	Clone 27	BD, 612168	43
<b>P-p38<sup>T180/Y182</sup></b>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		CST, #9211	43
<b>Paxillin (mk)</b>	Maus (mk)	1:1000	WB	Clone 349	BD610052	68
<b>P-Paxillin<sup>Y118</sup></b>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		Thermo, #44-722G	68
<b>P-Paxillin<sup>S126</sup></b>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		Thermo, #44-1022G	68
<b>P-Paxillin<sup>S178</sup></b>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		Thermo, #44-1026G	68
<b>Rac1</b>	Maus (mk)	1:2000	WB	Clone 102	BD, 610650	21
<b>Rac1b</b>	Kaninchen (pk)	1:1000	WB		Millipore, 09-271	24

Antigen	Ursprung	Verdünnung	WB/ IF	Klon	Hersteller und Artikelnummer	MG [kDa]
RhoGDI $\alpha$	Kaninchen (mk)	1:1000	WB	K21	Santa Cruz, sc-359	23
Vimentin	Kaninchen (mk)	1:1000	WB	D21H3	CST, #5741	57
Vinculin	Maus (pk)	1:4000	WB		Sigma-Aldrich, V4139	116
Vinculin	Maus (pk)	1:400	IF		Sigma-Aldrich, V4139	116

### 5.1.7 Sekundär-Antikörper

**Tabelle 8** Verwendete Fluoreszenz- bzw. HRP-gekoppelte Sekundär-Antikörper.

pk: polykonal; Biomol (Hamburg); Dianova (Hamburg); Li-Cor (Bad Homburg); NEB: New England BioLabs (Frankfurt a. M.); Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller und Artikelnummer
<b>IRDye® 680LT anti-mouse IgG (H+L)</b>	Ziege (pk)	1:15000	Li-Cor, 926-68020
<b>IRDye® 800CW anti-mouse IgG (H+L)</b>	Ziege (pk)	1:15000	Li-Cor, 926-32210
<b>IRDye® 680LT anti-rabbit IgG (H+L)</b>	Ziege (pk)	1:15000	Li-Cor, 926-68021
<b>IRDye® 800CW anti-rabbit IgG (H+L)</b>	Ziege (pk)	1:15000	Li-Cor, 926-32211
<b>Anti-mouse IgG, HRP-linked</b>	Ziege (pk)	1:4000	Sigma-Aldrich, A5278
<b>Anti-rabbit IgG, HRP-linked</b>	Ziege (pk)	1:4000	NEB, #7074
<b>Cy3 AffiniPure anti- rabbit IgG (H+L)</b>	Ziege (pk)	1:2000	Dianova, 111-166-045
<b>Cy3 conjugated anti- goat IgG (H+L)</b>	Esel (pk)	1:2000	Biomol, 605-704-125

### 5.1.9 Zellbiologische und molekularbiologische Kits

24 Well Bio-Assembler™ Kit	greiner bio-one, Frickenhausen
DNA-midi™ GT <i>Purification Kit</i>	Intron Biotechnology, Korea
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
NucleoBond <i>Finalizer</i>	Macherey-Nagel, Düren
ProtoScript II <i>Reverse Transcriptase</i>	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden

### 5.1.10 Marker

#### 5.1.10.1 Proteinmarker

<i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
---	-------------------------

#### 5.1.10.2 DNA-Marker

1 kb <i>DNA Ladder</i> (N3232L)	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
<i>DNA Molecular Weight Marker III</i> (0,12-21,2 kbp)	Roche Diagnostics, Mannheim

### 5.1.11 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen, wenn nicht anders angegeben.

AccuCount Fluorescent Particles, 10 <sup>6</sup> /ml	Spherotech, Inc., Lake Forest (Illinois), USA
30 % Acrylamid (Rotiphorese Gel A)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Serva Electrophoresis, Heidelberg
<i>Albumin bovine Fraction V</i> (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
2 % Bisacrylamid (Rotiphorese Gel B)	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Collagen I Rat Protein, Tail	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
Collagenase NB 4	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R 250	Merck Millipore, Darmstadt
Corning™ Cell Recovery Solution	Fisher Scientific, Schwerte
Corning™ Matrigel Membranmatrix	Fisher Scientific, Schwerte
Deoxynucleotide Mix, 10 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DharmaFECT 1 Transfection Reagent	Dharmacon, Lafayette, USA
4,6-Diamindin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
1x <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
10x <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
G-418 Sulfate (50 mg/ml)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
GlutaMAX Supplement	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
Glycerin	VWR International, Leuven, Belgien
jetPEI <i>DNA Transfection Reagent</i>	Polyplus transfection, Illkirch, Frankreich
Lipofectamine LTX <i>with Plus Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
MEM <i>Non-Essential Amino Acids Solution</i> (100x)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Midori Green Advance	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Mitomycin C	Santa Cruz, Heidelberg
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oligo(dT) <sub>15</sub> Primer	Promega, Mannheim
Opti-MEM I (1x)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Pierce <i>BCA Protein Assay Reagent A</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
QuantiTect SYBR green PCR Kit	Qiagen, Hilden
SensiFAST SYBR LoRox Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde
SuperSignal West Pico	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Texas Red-X Phalloidin	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Recombinant Human TGF $\beta$ 1	PeproTech, Hamburg
RT <sup>2</sup> SYBR Green ROX qPCR Mastermix	Qiagen, Hilden
Trypsin-EDTA (1x), Phenol-Rot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 5.1.12 Gebrauchswaren

6-Well Platte	Sarstedt, Nümbrecht
96 PCR-Platte randlos	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Adhesive Clear qPCR Seals, Sheets</i>	Biozym, Hessisch Oldendorf

Amersham Protran 0,45 µm Nitrocellulose	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
Deckglas (22 x 22 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Kanülen 25 G (0,5 x 25 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen (2 ml)	Nunc, Kamstrup, Denmark
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	LLG Labware, Meckenheim
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
µ-Slides 8 well	ibidi, Planegg
Tuberkulin-Spritzen (1 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Whatman <i>Chromatography Paper</i>	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (Ø 6 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt, Nümbrecht

### 5.1.13 Geräte

Blotkammer	C. B. S. Scientific Co., California, USA
CASY Cell Counter TTC	OLS, Bremen
Centro XS <sup>3</sup> LB960 High Sensitivity Microplate	
Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Elektrophoresekammer	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
ELx800 <sup>TM</sup> Absorbance Microplate Readers	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
EVOS FL Auto 2 <i>Cell Imaging System</i>	Invitrogen, Langenselbold
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Function line</i> Bakterieninkubator	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
<i>Fusion SL4-3000 WL Imagingsystem</i>	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gelgießstände	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gilson-Pipetten	Gilson International, Limburg-Offheim
HeatSealer S100	Eppendorf, Hamburg
HERAcell 150i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Heraeus <sup>TM</sup> Labofuge <sup>TM</sup> 400 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Inverses Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81	Olympus Europa SE, Hamburg
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Inverses Lichtmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Li-Cor Odyssey SA Imaging System	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
Li-Cor Odyssey CLx Imaging System	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
MaxQ 400 Bakterienschüttler	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Nalgene Mr. Frosty Cryo 1°C Freezing Containers	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt
Optima™ MAX-E Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Indianapolis, USA
pH Meter	Mettler Toledo, Gießen
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Stratagene Mx3005P	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415-R	Eppendorf, Hamburg
<i>xCELLigence RTCA-DP</i>	ACEA Biosciences, Bremen

### 5.1.14 Software

CASYdatadoc	OLS, Bremen
Celleste Imaging Analysis Software	Invitrogen, Langenselbold
CellSens Dimension 1.6	LEAD Technologies, Charlotte, USA
Fiji <i>OpenSource</i> Software	National Institutes of Health, USA [134]
Fusion (Version 15.18)	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gen5 (Version 2.00)	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
GraphPad Prism 5 (Version 5.03)	GraphPad Software, Inc., California, USA
Image Studio (Version 5.2.5)	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microwin 2000 (Version 4.41)	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Neunkirchen-Seelscheid
MxPro (Version 4.1)	Agilent Technologies, Waldbronn
RTCA Software (Version 2.1.0)	ACEA Biosciences, Bremen

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 2D Zellkultur

#### 5.2.1.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in DMEM Basalmedium, das mit 10 % FCS, 1 % GlutaMAX und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (wird im Folgenden als Zellkulturmedium bezeichnet) versetzt wurde, bei 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von >90 % im Brutschrank inkubiert. Um ein optimales Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurde alle 2-3 Tage das Zellkulturmedium gewechselt bzw. bei einer Konfluenz von 80-90 % ein Teil der Zellen auf neue Kulturgefäße verteilt. Hierfür wurden die Zellen einmal mit CMF-PBS gewaschen um Mediumreste vollständig zu entfernen. Die Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakte wurden anschließend durch die 5-minütige Inkubation mit 1x Trypsin-EDTA bei 37 °C gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen, wobei das darin enthaltene FCS die Aktivität des Trypsins inhibiert. Nach einer Zentrifugation von 3 min bei 300 x g wurde das Zellsediment in frischem Zellkulturmedium vereinzelt und ein Teil dieser Zellsuspension wurde entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit auf neue Zellkulturschalen ausgesät.

1x CMF-PBS (in H<sub>2</sub>O):

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### 5.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um den Bestand der Zellen zu gewährleisten, können eukaryotische Zellen eingefroren werden. Hierfür wurden die Zellen wie in 5.2.1.1 beschrieben mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst und für 3 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in DMSO-haltigem Einfriermedium resuspendiert und in Einfrierröhrchen verteilt. Diese wurden dann in einem Isopropanol-gefüllten Gefäß (Thermo Fisher Scientific) konstant und langsam auf -80 °C heruntergekühlt. Für die langfristige Lagerung der Zellen wurden diese nach ein paar Tagen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

Um Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die gefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und für 3 min bei 300 x g zentrifugiert um das enthaltene, toxische DMSO zu entfernen. Das Zellsediment wurde anschließend in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und auf einer Zellkulturschale verteilt. Die Zellen wurden anschließend wie in 5.2.1.1 beschrieben bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

DMSO-haltiges Einfriermedium (in DMEM pur):

10 % FCS

5 % DMSO

### 5.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mithilfe von Trypsin von der Platte abgelöst (siehe 5.2.1.1) und vereinzelt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 3 min bei 300 x g wurden die Zellen in 5-10 ml frischem Zellkulturmedium vereinzelt. Ca. 10 µl dieser Zellsuspension wurde in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die vier großen Eckquadrate ausgezählt. Durch die Multiplikation des errechneten Mittelwerts mit dem Faktor  $10^4$  (Quadratfläche x Kammertiefe) wurde die Zellkonzentration in Zellen/ml berechnet.

### 5.2.1.4 Automatisierte Bestimmung der Zellzahl mittels *CASY Cell Counter TTC*

Um die Verdopplungszeit von Zellen mit dem *Casy Cell Counter TTC* (OLS) zu bestimmen, wurden diese pro Zellklon viermal mit der gleichen Zellzahl ausgesät. Alle 24 h wurden die Zellen eines Wells pro Zellklon abgelöst (siehe 5.2.1.1) und mithilfe des *CASY Cell Counter TTC* (OLS) automatisch gezählt. Dafür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 ml *CASYton-Lösung* durch mehrmaliges Kippen gemischt. Die anschließende Messung mit dem *CASY Cell Counter TTC* (OLS) bestimmte die Anzahl der lebenden Zellen pro ml. Daraus wurde die Zellzahl der lebenden Zellen pro Well berechnet. Um die Unterschiede in der ausgesäten Zellzahl zwischen den Zelllinien zu minimieren, wurden die gemessenen Zellzahlen auf die Zellzahl zum Zeitpunkt 24 h normiert. Dieser normierte Wert wurde gegen die Zeit aufgetragen und eine Ausgleichskurve mittels Excel generiert. Die daraus erhaltene Steigung entspricht der Verdopplungskonstante  $\lambda$ . Mithilfe der Formel  $N(t) = N_0 * e^{\lambda * t}$  für exponentielles Wachstum wurde die Verdopplungszeit für alle stabil EGFP-, EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden Klone bestimmt.

### 5.2.1.5 Automatisierte Bestimmung der Zellzahl mittels *FACS Canto II*

Um die Verdopplungszeit der grün-fluoreszierenden Zellklone zu bestimmen, wurden die stabil EGFP-, EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen je viermal pro Zellklon ausgesät. Alle 24 h wurde die Zellzahl der grün-fluoreszierenden Zellen mithilfe des *FACS Canto II* (BD) bestimmt. Dabei wurde am ersten Messtag eine nicht-transfizierte Kontrolle mitgeführt, um die GFP-exprimierenden Zellen von den nicht-GFP-exprimierenden Zellen zu unterscheiden („*Gating*“). Für die eigentliche Zellzählung wurden 90 µl der jeweiligen Zellsuspensionen mit 10 µl *SPHERO AccuCount Particles* (Spherotech,  $c = 10^6$ /ml) versetzt, damit in allen Proben gleiche Volumina gemessen wurden. Mit der gemessenen Anzahl GFP-positiver Zellen wurde wie in 5.2.1.4 beschrieben die relative Verdopplungszeit berechnet.

### 5.2.1.6 Impedanz-Messung zur Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit

Um die Proliferationsgeschwindigkeit der EGFP-, EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klone zu bestimmen, wurden diese mithilfe des *xCELLigence RTCA-DP biosensor technology*-Systems (ACEA Biosciences) in Echtzeit nach Herstellerangaben analysiert. Dafür wurden  $1,2 \times 10^3$  Zellen pro Well in 10 % FCS-haltigem Zellkulturmedium auf einer *E-plate-16* ausgesät. Diese enthält mikro-elektronische Sensoren, mit denen über einen Zeitraum von 72 h kontinuierlich die Impedanz gemessen wurde. Mit der *RTCA Software* (ACEA Biosciences) wurde der Zellindex berechnet, der linear mit der Zellzahl korreliert und daraus die Verdopplungszeiten bestimmt. Um die Proliferationsgeschwindigkeiten der H23-Klone untereinander vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Verdopplungszeiten auf die Verdopplungszeit des EGFP A3-Klons normiert.

### 5.2.1.7 Plasmidtransfektion von HEK293 Zellen mit PEI

Um HA, HA-Rac1 bzw. HA-Rac1b ektop in HEK293-Zellen zu exprimieren, wurden diese Zellen transient mit entsprechenden Plasmiden transfiziert. Hierfür wurden  $6 \times 10^5$  Zellen pro 6 Well ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen am nächsten Tag mit dem Transfektionsreagenz PEI (Polyethylenimin) transfiziert. Hierfür wurden 2,2 µg Plasmid-DNA mit 10 µl PEI ( $c = 1 \text{ mg / ml}$ ) in 100 µl DMEM durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und die Transfektionslösung tröpfchenweise zu dem Zellkulturmedium der HEK293-Zellen gegeben. Nach 3 h Inkubation der Zellen bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> wurde 1 ml Zellkulturmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden etwa 24 h nach der Transfektion lysiert und proteinbiochemisch analysiert.

Für die Herstellung der stabil EGFP-, EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden HEK293-Klone wurden die HEK293-Zellen mit wie oben beschrieben mit pEGFP, pEGFP-Rac1 bzw. pEGFP-Rac1b transfiziert und durch die Zugabe des G418-Antibiotikums auf das Überleben transfizierter Zellen selektioniert.

### 5.2.1.8 Plasmidtransfektion von H23-Zellen mit Lipofectamine LTX

Um Plasmid-DNA in H23-Zellen zu transfizieren, wurden diese einen Tag vor der Transfektion mit einer Zelldichte von  $8 \times 10^5$  Zellen pro 60 mm-Schale ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine LTX nach Herstellerangaben transfiziert, wobei 5 µg Plasmid-DNA eingesetzt wurden. Um die toxische Wirkung des Transfektionsreagenz zu reduzieren, wurde nach 6 h ein Mediumwechsel durchgeführt. Die H23-Zellen wurden ca. 24 h nach Transfektion lysiert und proteinbiochemisch analysiert.

Für die stabile Integration des Konstrukts wurden die transfizierten Zellen durch die Zugabe des G418-Antibiotikums auf das Überleben der transfizierten Zellen selektioniert.

### 5.2.1.9 siRNA-Transfektion der EGFP- und EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klone

Um Adaptationseffekte der stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellklone von den Rac1b-spezifischen Effekten zu unterscheiden, wurde beispielhaft mit dem EGFP A3- und dem EGFP-Rac1b B1-Klon Knockdown-Experimente durchgeführt.

Hierfür wurden die Zellen mit  $3,75 \times 10^5$  Zellen pro 6 Well ausgesät. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen mit dem Transfektionsreagenz DharmaFECT 1 nach Herstellerangaben transfiziert, wobei 50 nM siRNA eingesetzt wurden. Das Transfektionsgemisch wurde nun tröpfchenweise zu 1,8 ml frischem Zellkulturmedium gegeben. Zur Reduktion der Toxizität wurde nach 6 h ein Mediumwechsel durchgeführt. Die proteinbiochemische Analyse erfolgte 72 h nach der Transfektion.

### 5.2.1.10 Dual Luciferase Reporter Assay

Um die Fähigkeit von Rac1 und Rac1b auf die Aktivierung von Promotoren zu untersuchen, wurden die H23-Zellen mit einem Reporterkonstrukt transfiziert, das die Firefly Luciferase unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors kodiert. Anschließend wurde die Luciferase-Menge spektralphotometrisch am Luminometer bestimmt.

Dafür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well in einer 24 Well-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit drei Plasmiden und dem Transfektionsreagenz jetPEI (Polyplus transfection) nach Herstellerangaben transfiziert. In Tabelle 9 sind die eingesetzten Plasmid- und Transfektionsreagenz-Mengen pro Well aufgelistet. Die angegebenen Plasmide bzw. das Transfektionsreagenz wurden hierfür mit jeweils 50  $\mu$ l NaCl-Lösung ( $c = 150$  mM) getrennt voneinander gemischt. Anschließend wurde die Transfektionsreagenz-enthaltende Lösung zu der Plasmid-enthaltenden Lösung gegeben und sorgfältig gemischt. Das Transfektionsgemisch wurde tröpfchenweise zu dem frischen Zellkulturmedium der H23-Zellen gegeben. Nach 24 h wurde die Luciferase-Aktivität mithilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay-Kits (Promega) gemessen. Die Zellen wurden dafür in *Passive Lysis Buffer* für 15 min bei Raumtemperatur lysiert und in Duplikaten (je 20  $\mu$ l Probe) von einem *Centro XS<sup>3</sup> LB960 High Sensitivity Microplate* Luminometer gemessen. Dieser applizierte automatisch 100  $\mu$ l LAR II (Luciferase Assay Substrate in Luciferase Assay Buffer II) pro Well. Diese Lösung enthält das Substrat der Firefly Luciferase, das während der Luciferase-katalysierten Reaktion Licht emittiert, das vom Luminometer gemessen wurde. Anschließend wurden 100  $\mu$ l *Stop & Glo Reagent* pro Well hinzugefügt, die die Firefly Luciferase-Aktivität inhibierte und das Substrat für die Renilla Luciferase enthielt. Dabei wurden im Luminometer relative Lichteinheiten (RLU) gemessen, die mit der jeweiligen Luciferase-Menge korrelierte. Bei der anschließenden Auswertung wurde eine Hintergrunds-Subtraktion durchgeführt. Für den Vergleich der Promotor-Aktivitäten spielte die Transfektionseffizienz eine wichtige Rolle, die mit den Renilla-Luciferase-Werten korrelierte. Daher wurde ein Quotient aus den gemessenen Firefly Luciferase-Werten und den gemessenen Renilla Luciferase-Werten

gebildet und aus den Duplikaten der Mittelwert bestimmt. Diese Mittelwerte wurden auf die Leervektor-transfizierten (pCGN) Proben normiert, um die Effekte von konstitutiv-aktivem HA-Rac1(G12V) und konstitutiv-aktivem HA-Rac1b(G12V) miteinander vergleichen zu können.

Tabelle 9 Pipettierschema der Luciferase-Transfektion im 24 Well-Format.

Lösung A	Lösung B
50 µl NaCl-Lösung	50 µl NaCl-Lösung
1,5 µl jetPEI	0,4 µg Promotor-Reporterkonstrukt (kodiert die Firefly Luciferase)
	0,3 µg pCGN / pCGN-HA-Rac1(G12V) / pCGN-HA-Rac1b(G12V)
	0,02 µg pRLTK (kodiert die Renilla Luciferase)

### 5.2.1.11 Migrationsassay

Um die Migrationsgeschwindigkeit der EGFP-, EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klone zu bestimmen, wurde der Wundverschluss mithilfe Zeit-aufgelöster Mikroskopie gemessen. Hierfür wurden die Zellklone mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro 12 Well ausgesät, sodass am nächsten Tag eine Konfluenz von 100 % erreicht wurde. Um die Proliferation der Zellen zu inhibieren, wurden die Zellen für 1 h mit 0,5 µg/ml Mitomycin C behandelt, bevor mit einer sterilen 10 µl Pipettenspitze zwei Wunden pro Well durch die konfluente Zellschicht gezogen wurden. Um die abgelösten Zellen aus dem Zellkulturmedium zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit CMF-PBS gewaschen und vorsichtig mit Zellkulturmedium überschichtet. Im Falle einer TGFβ1-Behandlung wurde in diesem Schritt 10 ng/ml TGFβ1 zu den Zellen pipettiert.

Die automatische Aufnahme des Wundverschlusses über die Zeit erfolgte mit dem *EVOS FL Auto 2 Cell Imaging System* (Invitrogen). Dabei wurden pro Well 6 Messpunkte definiert, die alle 3 h über einen Zeitraum von 50 h dokumentiert wurden. Die anschließende Analyse des Wundverschlusses erfolgte mithilfe der *Celleste Imaging Analysis Software* (Invitrogen) und der darin integrierten „*Wound healing*“-App. Mit der daraus berechneten Wundbreite wurde die Migrationsgeschwindigkeit in µm/h berechnet, wobei t die Zeit in Stunden angibt:

$$\text{Migration } [\mu\text{m pro h}] = \frac{1}{2} \frac{(\text{Wundverschluss } (t) - \text{Wundverschluss } (t = 0 \text{ h}))}{t}$$

Dabei wurde berücksichtigt, dass die Wunde von beiden Wundrändern verschlossen wurde. Um die Migrationsgeschwindigkeiten der Klone untereinander zu vergleichen, wurden die erhaltenen Werte auf die Migrationsgeschwindigkeit des unbehandelten EGFP A3-Klons normiert.

### 5.2.1.12 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode, mit der die zelluläre Lokalisation von Proteinen untersucht werden kann. In dieser Arbeit wurde die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin, Vinculin und F-Aktin in den H23-Klonen EGFP A3, EGFP-Rac1 D1 und EGFP-Rac1b B1 analysiert. Hierfür wurden die H23-Zellklone auf einem sterilen Deckgläschen in einem 12 Well ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen mit 1 ml CMF-PBS gewaschen und für 10 min mit 1 ml 2 % PFA (in CMF-PBS) (Paraformaldehyd) fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen nach einem weiteren Waschschriff mit 1 ml CMF-PBS für 8 min bei Raumtemperatur mit 1 ml 0,2 % Triton X-100 (in CMF-PBS) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 1 ml CMF-PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Hierfür wurden die Zellen für 1 h mit 3 % BSA (in TBST) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Um das BSA zu entfernen, wurden die Zellen einmal mit 1 ml TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper (anti- $\beta$ -Catenin, anti-Vinculin), der durch die vorherige Permeabilisierung in die Zelle diffundieren kann. Der Primär-Antikörper wurde in 0,3 % BSA (in TBS) entsprechend verdünnt und 100-150  $\mu$ l der Antikörper-Lösung vorsichtig auf die Zellen getropft ohne diese abzuspülen. In einer feuchten Kammer wurde dem Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur die Bindung an das Antigen ermöglicht. Um nicht-gebundene Primär-Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen dreimal vorsichtig mit je 1 ml TBS gewaschen. Für die visuelle Detektion der Proteine ist ein Sekundär-Antikörper notwendig, der gegen die Fc-Region des Primär-Antikörpers gerichtet und mit einem Cy3-Fluoreszenz-Marker gekoppelt ist. Dieser wurde ebenfalls, wie schon der Primär-Antikörper, entsprechend in 0,3 % BSA (in TBS) verdünnt. Die anschließende Inkubation der Zellen mit 100-150  $\mu$ l der Sekundär-Antikörper-Lösung erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer und bei vollständiger Dunkelheit, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzsignals zu reduzieren. Während dieses Schrittes wurden die Zellkerne mit 0,1  $\mu$ g/ml DAPI angefärbt, der zu der Sekundär-Antikörper-Lösung hinzugegeben wurde.

Das Aktin-Zytoskelett wird nicht mithilfe von Antikörpern nachgewiesen, sondern durch die direkte Bindung des Fluoreszenz-gekoppelten Phalloidins (Toxin des Knollenblätterpilzes) an F-Aktin. Das *Texas-Red*-gekoppelte Phalloidin wurde in 0,3 % BSA (in TBS) verdünnt und zusammen mit 0,1  $\mu$ g/ml DAPI auf die Zellen pipettiert. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten, abgedunkelten Kammer.

Nach der Sekundär-Antikörper-Inkubation bzw. der Phalloidin-Färbung wurden die Zellen dreimal mit 1 ml TBS gewaschen, um ungebundene Sekundär-Antikörper bzw. Reste des Phalloidins zu entfernen. Für die langfristige Lagerung und den Erhalt der Fluoreszenz wurden die Zellen zuerst in Wasser getaucht und anschließend mit Elvanol auf Objektträgern eingedeckt. Das Fluoreszenzsignal und somit die Lokalisation der Proteine wurde

anschließend am Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus iX81 und cellSens Software, Olympus) analysiert.

TBST (in H<sub>2</sub>O):

10 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl  
0,1 % Tween 20

Elvanol (in H<sub>2</sub>O):

10 % Mowiol 4-88  
25 % Glycerin  
0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

TBS (in H<sub>2</sub>O):

10 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl

## 5.2.2 3-dimensionale (3D) Zellkultur

### 5.2.2.1 3D-Kultivierung durch magnetische Levitation

Um die Zellen 3-dimensional wachsen lassen zu können, wurde die magnetische Levitation angewendet, die von Souza *et al.* [125] entwickelt und von der Firma n3D Biosciences, Inc. hergestellt wurde. Dabei wurden die Zellen nach Herstellerangaben behandelt:

Die H358- und H23-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 % im 6 Well mit NanoShuttle-PL für 24 h behandelt. Die eingesetzte NanoShuttle-Menge wurde hierfür an die Zellzahl angepasst (1 µl NanoShuttle-PL pro 8.000 Zellen), die durch die Bestimmung der Zellzahl eines zweiten Ansatzes festgestellt wurde (siehe 5.2.1.3). Am nächsten Tag wurden die Zellen abgelöst (siehe 5.2.1.1) und mit  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro 24 Well in zellabweisende Zellkulturgefäße ausgesät. Nach Einbringen der Zellen in ein magnetisches Feld bildeten die Zellen 3-dimensionale, im Medium schwebende Strukturen aus. Nach 72 h wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und für die proteinbiochemische Analyse lysiert.

### 5.2.2.2 Kultivierung der Zellen in einer 3D-Matrigelmatrix

Um die Interaktion von 3D-kultivierten Zellen mit der EZM zu untersuchen, wurden die Zellen in eine Matrigelmatrix eingebettet.

Hierfür wurde das Matrigel (Corning) über Nacht auf Eis bei 4 °C aufgetaut um eine vorzeitige Polymerisation des Matrigels (Corning) zu verhindern. Das gekühlte Zellkulturgefäß wurde mit einer zellfreien Matrigelschicht beschichtet, wobei 100 µl Matrigel pro 12 Well luftblasenfrei und gleichmäßig im Zellkulturgefäß verteilt wurden. Bei der anschließenden Inkubation bei 37 °C polymerisierte das Matrigel und wurde fest.

Für die darüberliegende, zellhaltige Matrigelschicht wurden die Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt (5.2.1.3) und eine Zelllinien-spezifische Zellzahl (siehe Tabelle 10) in 50 µl Zellkulturmedium vereinzelt. Diese Zellsuspension wurde mit 500 µl Matrigel durch Pipettieren gemischt und luftblasenfrei auf die zellfreie Matrigelbeschichtung gegeben. Durch eine weitere Inkubation von 30 min bei 37 °C polymerisierte die zellhaltige Matrigelmatrix und

wurde mit 1 ml Zellkulturmedium überschichtet, um die Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten.

Die Zellen wurden für 8-10 Tage bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert, wobei alle 2-3 Tage das Zellkulturmedium über dem Gel ausgetauscht wurde.

**Tabelle 10 Zellzahl in einer 3D Matrigel- und Kollagen I-Matrix im 12 Well Format**

Zelllinie	Zellkonzentration
<b>H358</b>	3,5 x 10 <sup>5</sup> Zellen / 12 Well
<b>H23</b>	7 x 10 <sup>5</sup> Zellen / 12 Well

### 5.2.2.3 Isolierung der Zellen aus der 3D Matrigelmatrix

Um die Zellen aus der 3D-Matrigelmatrix herauszulösen, wurde das Medium abgenommen und die Matrigelschicht mit kaltem TBS gewaschen. Die Matrigelschicht wurde mit 2 x 600 µl *Cell Recovery Solution* (Corning) in ein Reaktionsgefäß überführt. Um die Matrigelmatrix aufzulösen, wurde die Suspension für ca. 1 h auf Eis inkubiert, wobei sie alle 10-15 min gemischt wurde. Sobald sich das Matrigel komplett aufgelöst hatte, wurden die Zellen für 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert und einmal mit kaltem TBS gewaschen. Aus dem Zellpellet wurde anschließend entweder RNA- (siehe 5.2.4.1) oder Proteine-Lysate (siehe 5.2.3.1) hergestellt und analysiert.

### 5.2.2.4 Kultivierung der Zellen in einer 3D-Kollagen I-Matrix

Für die 3D-Kultivierung von H358- bzw. H23-Zellen in einer 1,5 mg/ml Kollagen I-Matrix wurde ein 12 Well-Zellkulturgefäß zunächst mit einer zellfreien Kollagen I-Schicht beschichtet. Hierfür wurden die in Tabelle 11 angegebenen Chemikalien durch Pipettieren gemischt und im 12 Well luftblasenfrei verteilt. Durch eine Inkubation von 30 min bei 37 °C polymerisierte die Kollagen I-Schicht. Für die darüberliegende, zellhaltige Schicht wurden die Chemikalien wie in Tabelle 11 mit 50 µl einer Zellsuspension mit definierter Zellzahl (Tabelle 10) luftblasenfrei gemischt und auf die zellfreie Kollagen I-Schicht pipettiert.

**Tabelle 11 Zusammensetzung der Kollagen I-Matrix im 12 Well Format.**

Chemikalien	zellfreie Schicht	zellhaltige Schicht
<b>10x DMEM</b>	6,9 µl	52,4 µl
<b>1 M NaOH</b>	1,7 µl	13,1 µl
<b>7,5 % NaHCO<sub>3</sub></b>	1,4 µl	10,5 µl
<b>1x DMEM pur</b>	39,1 µl	185,9 µl
<b>Kollagen I-Lösung (3 mg/ml)</b>	51,37 µl	393,6 µl
<b>Zellsuspension</b>	-	50 µl

Die Polymerisation erfolgte für 30 min bei 37 °C.

Um die Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, wurde die Kollagen I-Matrix mit 1 ml Zellkulturmedium überschichtet, das alle 2-3 Tage erneuert wurde.

Die Inkubation der Zellen in der Kollagen I-Matrix erfolgte für 8-10 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub>.

#### **5.2.2.5 Isolierung der Zellen aus der 3D Kollagen I-Matrix**

Um die Zellen aus der 3D-Kollagen I-Matrix herauszulösen, wurde das Medium entfernt und die Kollagen I-Matrix mit kaltem TBS gewaschen. Die Kollagen I-Matrix wurde in 2 x 650 µl einer 1,5 mg/ml Kollagenase-Lösung (Serva, in DMEM) in ein Reaktionsgefäß überführt. Bei 37 °C wurde das Kollagen I bei 37 °C und ständiger Rotation verdaut. Anschließend wurden die herausgelösten Zellen für 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert und einmal mit TBS gewaschen. Das Zellpellet wurde entsprechend für die Isolation von RNA (siehe 5.2.4.1) bzw. Proteine (siehe 5.2.3.1) behandelt.

#### **5.2.2.6 Modifizierte „3D on-top“ Kultivierung**

Für eine bessere Manipulation und Beobachtung der Zellen wurde eine vereinfachte 3D-Kultivierung, eine modifizierte Variante der „3D on-top“-Kultivierung, angewandt. Dabei wurden die Zellen entweder auf einer dünnen Matrigel- oder einer dünnen Kollagen I-Schicht ausgesät.

Für die Herstellung der dünnen Matrigelschicht wurden 200 µl kaltes Matrigel mit einer sterilen Pipettenspitze gleichmäßig und ohne Luftblasen auf einem 6 Well verteilt. Das Matrigel polymerisierte in einem anschließenden Inkubationsschritt für 30 min bei 37 °C. Für die Herstellung einer dünnen Kollagen I-Schicht wurden 200 µl Kollagen I-Lösung (Thermo Fisher Scientific) gleichmäßig in einem 6 Well verteilt und für 4 h bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Abnahme des überschüssigen Kollagen I wurde die dünne Kollagen I-Schicht weiter über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte sterilisiert, indem sie für 30 min mit UV-Licht bestrahlt wurde.

Anschließend wurden die H358- bzw. H23-Zellen mit  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro 6 Well bzw.  $1,0 \times 10^6$  Zellen pro 6 Well auf die Hydrogel-Schicht ausgesät, sodass sie nach 72 h eine Konfluenz von 90-95 % erreichten.

#### **5.2.2.7 Bestimmung der Proliferationsrate mittels Ki67-Färbung**

Um die Proliferation von Zellen zu analysieren, die auf einer dünnen Matrigel-Schicht kultiviert wurden, wurden *µ-Slides 8 well* (ibidi) mit 25 µl Matrigel gleichmäßig und luftblasenfrei beschichtet. Nach der Polymerisation bei 37 °C für 30 min wurden  $1,3 \times 10^5$  H358- bzw.  $1,2 \times 10^5$  H23-Zellen pro Well ausgesät. Als Kontrolle wurden  $0,8 \times 10^5$  bzw.  $0,7 \times 10^5$  H358- bzw. H23-Zellen auf unbeschichteten Wells ausgesät. Am nächsten Tag erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % und wurden mit 2 % PFA (in CMF-

PBS) für 10 min fixiert. Die Ki67-Färbung erfolgte wie in 5.2.1.12 beschrieben. Die Färbung erfolgte mit einem anti-Ki67-Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur. Nach der Färbung wurden die Zellen direkt am Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Hierfür wurden pro Bedingung sechs Gesichtsfelder dokumentiert und die Ki67<sup>+</sup>- und die DAPI<sup>+</sup>-Zellen gezählt. Der Quotient aus den Ki67<sup>+</sup>- und DAPI<sup>+</sup>-Zellen stellt den Anteil der proliferierenden Zellen dar. Dieser wurde für alle sechs Gesichtsfelder gemittelt.

## 5.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 5.2.3.1 Zellyse

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden die 2D-kultivierten Zellen, einmal mit kaltem CMF-PBS gewaschen und anschließend in einer entsprechenden Menge an NOP-Lysepuffer mit einem Zellschaber abgeschabt. Zellen, die auf oder in einer Hydrogelmatrix kultiviert wurden, wurden aus dieser herausgelöst (siehe 5.2.2.3 bzw. 0) und das erhaltene Zellsediment einmal mit CMF-PBS gewaschen, bevor die Zellen in NOP-Puffer resuspendiert wurden. Um eine Degradation bzw. eine Dephosphorylierung der Proteine zu vermeiden, wurden dem NOP-Lysepuffer ein Protease-Inhibitor-Mix bzw. ein Phosphatase-Inhibitor-Mix beigefügt. Die Zellsuspension wurde anschließend durch siebenmaliges Aufziehen durch eine 26G-Injektionsnadel homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 4 °C und 16.000 x g wurden die Zelltrümmer von der proteinhaltigen Lösung getrennt. Der Überstand wurde dann für weitere Experimente verwendet. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### NOP-Puffer (in H<sub>2</sub>O):

10 mM Tris-HCl pH 7,4  
150 mM NaCl  
1 % NP40  
0,5 % Triton X-100  
2 mM EDTA pH 8,0  
2 mM EGTA pH 8,0

#### 1x Protease-Inhibitor-Mix (in H<sub>2</sub>O):

1 µM Aprotinin  
1 mM Pefabloc  
2,5 µM Sojabohnen-Trypsininhibitor  
2,1 µM Leupeptin

#### 1x Phosphatase-Inhibitor-Mix (in H<sub>2</sub>O):

10 mM NaF  
1 mM Na-Orthovanadat  
25 mM β-Glycerophosphat  
10 mM Na-Pyrophosphat  
750 nM Okadasäure

### 5.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA

Um ein gleichmäßiges Auftragen der Proben zu ermöglichen, wurde die Proteinkonzentration der Proben mithilfe des *Bicinchoninic Acid Protein Assays* (BCA Assay) bestimmt. Dabei bewirkten die Peptidbindungen unter alkalischen Bedingungen die Reduktion der enthaltenen Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu Cu<sup>+</sup>-Ionen. Diese Reaktion erfolgte proportional zur Proteinmenge. Diese Cu<sup>+</sup>-Ionen werden durch die Bicinchoninsäure gebunden, was zu

einem Farbumschlag von grün nach violett führt und dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm mit einem Spektrometer gemessen werden kann [135].

Für die Konzentrationsbestimmung wurde das Proteinlysate 1:10 mit Wasser verdünnt und als Duplikate mit je 20 µl Volumen auf eine 96 Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Als Referenz wurde eine Eichreihe mit BSA-Konzentrationen zwischen 0 und 125 µg/ml (0 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml und 125 µg/ml) mitgemessen.

Zu dem 20 µl Proben- bzw. Eichreihen-Volumen wurden 180 µl des BCA-Färbereagens hinzugefügt. Dieses bestand zu 50 Teilen aus Bicinchoninsäure (Thermo Fisher Scientific) und zu einem Teil aus 4 % Kupfer-(II)-sulfat-Lösung. Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C und die Absorptionsmessung wurde mithilfe des Bio-Tek ELx800 *Absorbance Microplate Reader* bei 562 nm gemessen. Mit den daraus erhaltenen Extinktionswerten wurde die Geradengleichung der Eichreihe bestimmt und anhand dieser die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet.

### 5.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Identifikation von Proteinen wurden diese unter denaturierenden Bedingungen mithilfe der SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wurden die Proben zunächst mit einem reduzierenden SDS-Probenpuffer versetzt, der unter anderem SDS und DTT enthält und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Dies bewirkte die Denaturierung der Proteine. Das im Probenpuffer enthaltene DTT bewirkte zusätzlich eine Reduktion der freigelegten Disulfidbrücken und das enthaltene SDS maskierte die Ladung der Aminosäuren, sodass die Proteine linearisiert und einheitlich negativ geladen vorlagen. Diese wurden anschließend

Tabelle 12 Herstellung eines Polyacrylamid-Gels.

SDS-Gel (80x50x1 mm <sup>3</sup> )	Sammelgel	Trenngel			
		8,5 %	10 %	12,5 %	15 %
Trennbereich		50-150 kDa	40-130 kDa	20-100 kDa	10-60 kDa
30 % Acrylamid	190 µl	1,15 ml	1,3 ml	1,625 ml	1,975 ml
2 % Bisacrylamid	75 µl	450 µl	500 µl	600 µl	800 µl
3 M Tris-HCl pH 8,8	-	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
1 M Tris-HCl pH 6,8	190 µl	-	-	-	-
10 % SDS	15 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
60 % Saccharose	375 µl	-	-	-	-
H <sub>2</sub> O	650 µl	1,8 ml	1,6 ml	1,225 ml	700 µl
TEMED	2 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
10 % APS	20 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

mithilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel, die sich hinsichtlich des pH-Wertes, der Ionenkonzentration und der Porengröße unterscheiden. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 12 aufgelistet, wobei sich die Mengenangaben jeweils auf ein Gel der Größe 80 mm x 50 mm x 1 mm bezieht. Das Trenngel wurde zwischen zwei gereinigte Glasplatten gegossen und mit Wasser-gesättigtem Isobutanol überschichtet, um eine gerade Trennschicht zu erhalten. Das Trenngel polymerisierte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde das Sammelgel über das Trenngel geschichtet und ein Probenkamm eingeführt. Nach einer Polymerisationsdauer von ca. 15 min wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Laufkammer gespannt und mit SDS-Laufpuffer befüllt.

In jede Geltasche wurden gleiche Proteinmengen (30 µg bzw. 50 µg) mit SDS-Probenpuffer gemischt und aufgetragen. Für den Vergleich der Proteingröße wurde zusätzlich ein Proteinmarker analysiert, der ausschließlich Proteine bekannter Größe enthielt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wurden die Proteine im Sammelgel für 15 min bei 80 V konzentriert. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 110 V, bis die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

5x SDS-Probenpuffer (in H<sub>2</sub>O):

200 mM Tris-HCl

5 mM EDTA pH 8,0

1 M Saccharose

1 mM DTT

2 % SDS

0,1 % Bromphenolblau

1x SDS-Laufpuffer (in H<sub>2</sub>O):

50 mM Tris-HCl

500 mM Glycin

0,1 % SDS

#### 5.2.3.4 Western Blot und immunchemischer Nachweis

Der Transfer von Proteinen erfolgte mithilfe des Western Blots und der anschließende immunologische Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper. Bei dieser Methode werden die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierfür wurde das sog. Nass-Blot-Verfahren angewandt, bei dem das gesamte Blot-Verfahren in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer ablief. Dabei wurden zunächst die verwendeten Schwämme, Filterpapiere, die Nitrocellulose-Membran und das Polyacrylamid-Gel im Transferpuffer äquilibriert. Beim Zusammenbau des Nassblots muss beachtet werden, dass sich die Nitrocellulose auf der Anodenseite des Polyacrylamid-Gels befindet. Für eine gute Transferqualität dürfen sich zwischen dem Polyacrylamid-Gel und der Nitrocellulose-Membran keine Luftblasen befinden. Daher wurde unter das Polyacrylamid-Gel und auf die Nitrocellulose-Membran Filterpapiere (Whatman-Papiere) und Schwämme gelegt, die durch ein Kunststoffgitter einen leichten und gleichmäßigen Druck auf das Gel und die Membran

ausübten. Dieses Kunststoffgitter wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Blot-Kammer gehängt. Durch Anlegen eines Spannungsfeldes migrierten die negativ geladenen Proteine auf die Nitrocellulose-Membran, woran sie aufgrund ihrer polaren Eigenschaft binden konnten. Das im Transferpuffer enthaltene Methanol verbesserte die Bindung der Proteine an die Membran. Die Transfer-Dauer und angelegte Spannung hing dabei vom Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine ab: Beim Nachweis von kleineren Proteinen bis ca. 100 kDa bzw. beim Nachweis von Protein-Phosphorylierungen erfolgte der Transfer für 1 h bei 70 V, während der Transfer von größeren Proteinen ab 100 kDa für 10-12 h bei 20 V durchgeführt wurde.

Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran mit den gebundenen Proteinen in H<sub>2</sub>O gewaschen um Reste des Transferpuffers, insbesondere des Methanols, zu entfernen. Um die Qualität des Proteintransfers zu überprüfen, wurde die Nitrocellulose-Membran anschließend für 1 min mit einer Ponceau Rot-Lösung angefärbt. Dieser Farbstoff bindet reversibel an positiv geladene Aminosäuren. Um den rot gefärbten Hintergrund zu reduzieren, wurde die Membran mit H<sub>2</sub>O gewaschen, sodass spezifische Banden auf der Nitrocellulose-Membran nachweisbar waren, die digital durch Scannen der Membran dokumentiert wurden. Nach dem Zuschneiden wurde die Nitrocellulose-Membran durch die Inkubation in TBS für ca. 5 min auf einer Wippe vollständig entfärbt.

Für den Nachweis spezifischer Proteine mittels Antikörper wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen durch die Inkubation mit 5 % Milchpulver (in TBS) für 1 h unter Schütteln abgesättigt. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran einmal mit TBS gewaschen um überschüssiges Blocking-Reagenz zu entfernen. Die Inkubation mit dem spezifischen Primär-Antikörper erfolgte auf einer Wippe über Nacht bei 4 °C. Die Primär-Antikörper wurden in 3 % BSA (in TBST) entsprechend der Tabelle 7 verdünnt.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 min bei Raumtemperatur mit TBST gewaschen um ungebundene Primär-Antikörper vollständig zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper, der in der Regel gegen die Fc-Region des Primär-Antikörpers gerichtet ist. Dieser Sekundär-Antikörper wurde entsprechend der Tabelle 8 in 3 % BSA (in TBST) verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur mit der Nitrocellulose-Membran unter ständigem Wippen inkubiert. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran zweimal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen um ungebundene Sekundär-Antikörper zu entfernen.

Die Sekundär-Antikörper sind entweder an einen Fluoreszenz-Farbstoff oder eine Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) gekoppelt, die unter Zugabe des Substrats ein chemilumineszente Reaktion katalysiert.

Die Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurden mit dem *Odyssey Sa*

*Infrared Imaging System* bzw. dem *Odyssey CLx Imaging System* (LI-COR) detektiert. Hierbei wurden die gekoppelten Fluorochrome mit einer Wellenlänge von 680 nm bzw. 800 nm angeregt. Diese emittierten daraufhin Licht, das von dem *Odyssey*-System erfasst und abgebildet wurde. In diesem System konnten zwei verschiedene Wellenlängen verwendet werden um die Fluorochrome unabhängig voneinander anzuregen. Daher ist es mit diesem System möglich verschiedene Proteine gleichzeitig nachzuweisen.

Die HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurden durch eine Chemilumineszenz-Reaktion detektiert. Hierfür wurde die Membran für 3 min im Dunkeln mit dem *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* inkubiert. Dieses setzt sich zu gleichen Teilen aus der *Luminol/Enhancer Solution* und der *Stable Peroxide Solution* zusammen. Das enthaltene Luminol wird während der chemilumineszenten Reaktion von der Peroxidase zu Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm umgewandelt, das mithilfe des *Fusion SL4-3500 WL Chemiluminescence Imaging System* detektiert und als schwarze Bande dargestellt wurde.

Zur Bestimmung der relativen JNK2-Aktivität und der Rac1-Proteinmenge wurde die Bandenintensität mithilfe von Fiji bzw. der Image Studio Software quantifiziert, die die Pixelintensität der einzelnen Banden bestimmten. Zur Berechnung der relativen JNK2-Aktivität wurden die gemessenen P-JNK2<sup>T183/Y185</sup>-Werte auf die JNK2-Werte normiert und in Relation zur entsprechenden mock-Kontrolle dargestellt.

Für die Bestimmung der endogenen Rac1-Proteinmenge wurde die Rac1-Bandenintensität zunächst auf die GAPDH-Bandenintensität normiert und anschließend in Bezug zum 2D-kultivierten, stabil EGFP-exprimierenden H23-Zellklon A3 dargestellt.

Transferpuffer (in H<sub>2</sub>O):

25 mM Tris-HCL

0,1 % SDS

1,5 % Glyzin

20 % Methanol

Ponceau Rot-Färbung (in H<sub>2</sub>O):

0,2 % Ponceau S

3 % Trichloressigsäure

### 5.2.3.5 Triton X-100 Fraktionierung

Bei Triton X-100 handelt es sich um ein Detergenz, das Membranen auflösen kann und so die Triton X-100 löslichen Proteine freisetzt. Durch diese Behandlung werden Zytoskelett-Proteine und Zytoskelett-verankerte Proteine angereichert. Dabei wurde die Triton X-100-Fraktionierung nach Hinck *et al.* [136] durchgeführt. Bei einer Konfluenz von ca. 90-100 % wurden die Zellen einmal mit 5 ml 1 mM CaCl<sub>2</sub> (in TBS) gewaschen. Anschließend wurden pro 10 cm-Zellkulturschale 300 µl Triton-Puffer hinzugegeben und für 10 min bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und durch dreimaliges Aufziehen in eine 26G-Injektionsnadel homogenisiert. Durch einen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 16.000 x g und 4 °C wurde die Triton X-100 lösliche

(Überstand) von der Triton X-100 unlöslichen (Sediment) Fraktion getrennt. Das Triton X-100 unlösliche Zellsediment wurde in 150 µl RIPA-Puffer (inkl. Protease-Inhibitor-Mix) aufgenommen und durch achtmaliges Aufziehen in eine 26G-Injektionsnadel erneut homogenisiert. Diese Lösung wurde erneut für 10 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun die Triton X-100 unlösliche Fraktion, die hauptsächlich Zytoskelett-Proteine und Zytoskelett-verankerte Proteine enthielt.

Je 50 µg dieser Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (siehe 5.2.3.3) und Western Blot analysiert (siehe 5.2.3.4).

10x Krebs-Ringer-HEPES-Puffer pH 7,4 (in

H<sub>2</sub>O):

25 mM HEPES

100 mM NaCl

5 mM KCl

10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,2 mM MgSO<sub>4</sub>

20 mM CaCl<sub>2</sub>

RIPA-Puffer pH 7,2 (in H<sub>2</sub>O):

50 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

1 % Triton X-100

0,5 % Na-Deoxycholat

0,1 % SDS

1 x Protease-Inhibitor-Mix

Triton-Puffer (in H<sub>2</sub>O):

1 x Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

0,5 % Triton X-100

300 mM Saccharose

### 5.2.3.6 Herstellung von Membran- bzw. Zytosol-angereicherten Zellfraktionen

Die intrazelluläre Lokalisation von EGFP, EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b in den H23-Klonen wurde durch die Herstellung Membran- bzw. Zytosol-angereicherten Zellfraktionen analysiert. Bei einer Konfluenz von 100 % wurden die Zellen zweimal mit CMF-PBS gewaschen um Medium-Rückstände vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden in kaltem HEPES-Puffer lysiert und durch mehrmaliges Aufziehen in eine 26G-Injektionsnadel homogenisiert. Das Lysat wurde anschließend für 2 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert, wobei Kerne und Organelle am Boden sedimentierten und von den löslichen Zellbestandteilen abgetrennt wurden. Der Überstand enthält das Gesamtlysat, wovon 50 µg als Kontrolle mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Das restliche Gesamtlysat wurde verwendet um mittels mehrerer Zentrifugationsschritte Membran- und Zytosol-angereicherte Zellfraktionen herzustellen.

Hierfür wurde das Gesamtlysat für 1 h bei 100.000 x g und 4 °C zentrifugiert, wobei die zellulären Membranen sedimentierten. Der Überstand enthielt die Zytosol-angereicherte Fraktion S100 (*soluble*, 100.000 x g).

Auf das Membran-haltige Sediment wurde vorsichtig 250 µl HEPES-Puffer pipettiert und direkt wieder abgenommen ohne das Pellet zu zerstören. Bei einem weiteren Waschschrift

wurde das Pellet in 250 µl HEPES-Puffer resuspendiert und durch einen Zentrifugationsschritt für 15 min bei 100.000 x g und 4 °C erneut sedimentiert. Das Sediment wurde anschließend in 50-100 µl RIPA-Puffer aufgenommen, wobei das Sediment mithilfe eines Pistills vorsichtig abgelöst wurde. Bei dieser Lösung handelte es sich nun um die Membran-angereicherte Zellfraktion P100 (partikulär, 100.000 x g).

Für die weitere Analyse der intrazellulären Lokalisation von EGFP, EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b wurden 50 µg des Gesamtlisat, sowie 50 µg der Zytosol- und 25 µg der Membran-angereicherten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Dabei wurden die Proteine Caveolin bzw. RhoGDI angefärbt, um die Reinheit der Membran- bzw. Zytosol-angereicherten Fraktionen zu dokumentieren.

HEPES-Puffer (in H<sub>2</sub>O):

50 mM HEPES pH 7,6

8,6 % Saccharose

10 mM EDTA pH 8,0

10 mM EGTA pH 8,0

1x Protease-Inhibitor-Mix

RIPA-Puffer (in H<sub>2</sub>O):

50 mM Tris-HCl pH 8,0

150 mM NaCl

0,5 % Na-Deoxycholat

1 % Triton X-100

0,1 % SDS

1x Protease-Inhibitor-Mix

### 5.2.3.7 Rac-Aktivitätsassay

Um den Anteil des aktiven, GTP-gebundenen EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b in den EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klonen zu bestimmen, wurden Rac-Aktivitätsassays durchgeführt.

Dabei wurden die H23-Klone auf 10 cm-Schalen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz in Rac-RIPA-Puffer lysiert. Das Lysat wurde wie in 5.2.3.1 hergestellt und die Proteinkonzentration nach 5.2.3.2 bestimmt.

Für den Rac-Aktivitätsassay wurden die Glutathion-Sepharose 4B *Beads* zweimal mit 200 µl Rac-RIPA-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Rac-Bindedomäne von PAK (PAK-RBD), die an ein GST-Tag (GST-PAK-RBD) fusioniert ist, für 30 min bei 4 °C unter Rotation an die Glutathion-Sepharose 4B *Beads* gekoppelt. Nur aktives, GTP-gebundenes Rac kann von der PAK-RBD spezifisch gebunden werden. Vor der Zugabe des jeweiligen Lysats wurden 50 µg als Lysatkontrolle abgenommen.

Nach der Zugabe des Proteinlysats (0,5-1 mg) zu 50-200 µl GST-PAK-RBD-gekoppelten *Beads* wurde die Suspension für 1 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Um andere Proteine sowie inaktives, GDP-gebundenes EGFP-Rac zu entfernen, wurden die GST-PAK-RBD-gekoppelten *Beads* dreimal mit 300 µl PAK-Waschpuffer gewaschen.

Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose 4B *Beads* mit einer Hamiltonspritze trocken gesaugt, bevor sie in 20 µl 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 8 min bei 95 °C

erhitzt wurden. Der Nachweis der GTP-gebundenen Rac1- und Rac1b-Mengen erfolgte mittels Western Blot und einem anti-GFP-Antikörper.

Rac-RIPA-Puffer (in H<sub>2</sub>O):

50 mM Tris-HCl pH 7,2  
 150 mM NaCl  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 % Triton X-100  
 0,5 % Na-Deoxycholat  
 0,1 % SDS  
 10 µg/ml Leupeptin  
 10 µg/ml Aprotinin  
 1 mM PMSF

PAK-Waschpuffer (in H<sub>2</sub>O):

50 mM Tris-HCl pH 7,2  
 150 mM NaCl  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,5 % Triton X-100  
 1 mM DTT  
 0,1 mM PMSF  
 10 µg/ml Aprotinin  
 10 µg/ml Leupeptin

## 5.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.4.1 Isolation von RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA aus Zellen wurde mithilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Elution wurde 30 µl (6 Well) bzw. 50 µl (60 mm Zellkulturschale) RNase-freies Wasser für 5 min bei Raumtemperatur auf der Säule inkubiert und anschließend bei 15.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde anschließend mit dem NanoDrop 1000 (siehe 5.2.4.2) bestimmt.

### 5.2.4.2 Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA- oder RNA-Konzentration erfolgte mithilfe des NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Für die Messung von doppelsträngigen DNA-Proben mit einem anerkannten Extinktionskoeffizienten von 50 ng\*cm/µl wird das Modul „DNA-50“ und für die Messung von RNA-Proben mit einem Extinktionskoeffizienten von 40 ng\*cm/µl wurde das Modul „RNA-40“ verwendet.

Hierfür wurde nach der Initialisierung des Geräts eine Hintergrund-Messung durchgeführt, bei der 1 µl der Elutions-Lösung spektrometrisch über einen Wellenlängen-Bereich von 220-750 nm analysiert wurde. Anschließend erfolgte die Messung der DNA- bzw. RNA-Proben. Dabei wurde ebenfalls 1 µl der Probe aufgetragen und über denselben Wellenlängenbereich analysiert. Die Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dafür wurde die Extinktion für jede Wellenlänge mit folgender Formel berechnet:

$Extinktion = -\log\left(\frac{Intensität [Probe]}{Intensität [Blank]}\right)$ . Mithilfe der Beer-Lambert-Gleichung wurde die

Extinktion mit der Konzentration korreliert:  $c = \frac{A * e}{b}$ . Dabei entspricht A der zuvor berechneten Extinktion [arbitrary unit], e dem Wellenlängen-abhängigen Extinktionskoeffizienten [ng\*cm/µl], b der Pfadlänge [cm] und c der Probenkonzentration [ng/µl].

Um die Qualität der DNA- bzw. RNA-Probe zu überprüfen, wurde das 260/280- und das 260/230-Verhältnis analysiert.

Das 260/280-Verhältnis spiegelt die Reinheit der Probe wider. Dabei sollte das 260/280-Verhältnis bei DNA-Proben einen Wert von ca. 1,8 und bei RNA-Proben einen Wert von ca. 2,0 betragen. Ein davon deutlich abweichender Wert deutet auf eine Kontamination mit Proteinen oder Phenol hin, die stark bei ca. 280 nm absorbieren.

Mit dem 260/230-Verhältnis kann ebenfalls die Reinheit der Probe überprüft werden. Diese Werte sind meist höher als das gemessene 260/280-Verhältnis und sollten in einem Bereich von 2,0-2,2 liegen. Starke Abweichungen von diesen Werten deuten auf Kontaminationen mit EDTA, Carbohydraten oder Phenol hin, die ebenfalls bei ca. 230 nm absorbieren.

#### 5.2.4.3 cDNA-Synthese

Um die Genexpression in den 2D- und 3D-kultivierten Zellen zu analysieren, wurde die isolierte RNA (siehe 5.2.4.1) mithilfe der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben, die in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt werden kann. Dabei wurde 1 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 11 µl verdünnt und mit 1 µl Oligo(dT)<sub>15</sub> Primer (c = 500 µg/ml; Promega) und 1 µl dNTP-Mix (c = 10 mM; Sigma-Aldrich) gemischt. Die RNA/Primer-Lösung wurde durch einen 5-minütigen Inkubationsschritt bei 65 °C denaturiert. Die Lösung wurde direkt nach dem Erhitzen auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 µl *5x ProtoScript II Reverse Transcriptase*-Puffers (NEB) und 2 µl 0,1 M DTT hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Diese Lösung wurde anschließend für 2 min bei 25 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl *ProtoScript II Reverse Transcriptase* (NEB) wurde die Lösung für 10 min bei 25 °C inkubiert. In dieser Zeit binden die Oligo(dT)-Primer an den 3'-Poly-A-Schwanz der RNA. Die reverse Transkription erfolgte anschließend bei 42 °C für 50 min. Danach wurde das Enzym inaktiviert, indem die Lösung für 15 min bei 70 °C erhitzt wurde.

Die abgekühlte cDNA-Lösung wurde mit RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt.

#### 5.2.4.4 Gelelektrophoretische Analyse der DNA und RNA

Für die Analyse der Fragmentgröße nach einem Restriktionsverdau oder einer RT-PCR sowie für die Qualitätsüberprüfung der isolierten RNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Dabei wanderte die DNA und RNA aufgrund ihres negativ-geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Agarose bildete dabei ein polymeres Netzwerk aus, das je nach eingesetzter Agarose-Konzentration unterschiedliche Porengrößen aufwies. Für die Analyse von kleineren Nukleinsäure-Fragmenten wurde eine höhere Agarose-Konzentration von 2 % verwendet, während für die Analyse größerer

Nukleinsäuren eine geringere Agarose-Konzentrationen von 1 % Agarose genutzt wurde. Für die Herstellung von 1 % bzw. 2 % Agarosegelen, wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und vollständig gelöst. Nach kurzem Abkühlen unter kaltem Wasser wurde die noch vollständig flüssige Agarose-Lösung mit *Midori Green Advanced* (4 µl pro 100 ml Agarose-Lösung) versetzt. *Midori Green Advanced* ist ein positiv geladenes Molekül, das in einem elektrischen Feld zur Kathode wandert und daher entgegengesetzt zu den Nukleinsäuren migriert. Dabei interkaliert es mit den Nukleinsäuren, wodurch diese durch die Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden können.

Die flüssige Agarose-Lösung wurde luftblasenfrei in eine Gelkammer gefüllt und ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Agarosegel in eine Gelkammer eingesetzt, die mit TAE-Puffer gefüllt wurde. Die Proben wurden zunächst mit Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenreferenz wurde ein entsprechender DNA-Marker (100 bp bzw. 1 kb, NEB) mitgeführt, der DNA-Fragmente bekannter Größe enthielt.

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei 80 V für 60-90 min. Für die Detektion wurden die Nukleinsäuren nach der Auftrennung durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht.

<u>TAE-Puffer (in H<sub>2</sub>O):</u>	<u>10x Ladepuffer (in H<sub>2</sub>O):</u>
0,8 mM Tris-HCl pH 8,0	0,25 % Orange G
0,4 mM Essigsäure	50 % Glycerin
0,02 mM EDTA pH 8,0	1 mM EDTA pH 8,0

#### 5.2.4.5 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Um die Genexpression in den 2D- und 3D-kultivierten Zellen vergleichend zu analysieren, wurde die RNA-Menge nach der reversen Transkription in cDNA mittels der quantitativen Real-time PCR (qRT-PCR) analysiert. Bei dieser Methode interkalierte der Fluoreszenz-Farbstoff *SYBR green* während der Amplifikation in den DNA-Doppelstrang, wodurch er blaues Licht (494 nm) absorbierte und grünes Licht (521 nm) emittierte. Nach jedem Amplifikationszyklus wurde die Fluoreszenz-Intensität gemessen, was eine DNA-Quantifizierung in Echtzeit ermöglichte.

Die Quantifizierung erfolgte dabei in Duplikaten mit den in Tabelle 13 bzw. Tabelle 14 dargestellten Zusammensetzung in einer 96 Well-Platte. Dabei wurden in Abhängigkeit der Primer unterschiedliche *SYBR green* Master Mixe verwendet: Für die Validierung der *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays* wurde der *QuantiTect SYBR green PCR Kit* (Qiagen) und für die Analyse der EMT-Transkriptionsfaktoren wurde der *SensiFAST SYBR LoRox Kit* (Bioline) verwendet. Die Platte wurde anschließend mithilfe einer *Adhesive Clear qPCR Seal-Folie* (Biozym) und dem HeatSealer S100 (Eppendorf) versiegelt, um ein Verdampfen der Reaktionslösung während der Amplifikation zu verhindern.

Tabelle 13 Zusammensetzung eines qRT-PCR-Ansatzes mit dem QuantiTect SYBR green PCR Kit.

Komponenten	
QuantiTect SYBR green PCR Kit	12,5 µl
10x QuantiTect Primer Assay	2,5 µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	9 µl
cDNA	1 µl

Tabelle 14 Zusammensetzung eines qRT-PCR-Ansatzes mit dem SensiFAST SYBR LoRox Kit.

Komponenten	
SensiFAST SYBR LoRox Kit	10 µl
Primer (forward/back, je 10 µM)	2 µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	7 µl
cDNA	1 µl

Die Amplifikation der cDNA und die Messung der Fluoreszenz-Intensität erfolgte mit dem *Stratagene Mx3005P qPCR System* (Agilent) und in Abhängigkeit des eingesetzten *SYBR green* Mastermix mit dem folgenden Amplifikationsprogramm:

qRT-PCR Programm mit QuantiTect SYBR green PCR Kit		
<b>Denaturierung</b>	95 °C	15 min
<b>Amplifikation</b>	94 °C	30 sec
	55 °C	30 sec
	72 °C	30 sec
		} 40x
<b>Dissoziationskurve</b>	95 °C	1 min
	55 °C	30 sec
	55-95 °C	

qRT-PCR Programm mit SensiFAST SYBR LoRox Kit		
<b>Denaturierung</b>	95 °C	5 min
<b>Amplifikation</b>	95 °C	45 sec
	55 °C	45 sec
	72 °C	1 min
		} 40x
<b>Dissoziationskurve</b>	95 °C	1 min
	55 °C	30 sec
	55-95 °C	

Die dabei ermittelten Ct-Werte geben die Zykluszahl an, bei der die Fluoreszenz-Intensität einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Die relative Quantifizierung erfolgte mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode nach Livak *et al.* [137]. Bei dieser Methode wurde die Expression eines Zielgenes mit der Expression des Referenzgenes GAPDH verglichen, wobei der Mittelwert der Duplikat-Messungen verwendet wurde:  $\Delta Ct = Ct_{MW}(\text{Zielgen}) - Ct_{MW}(\text{GAPDH})$ . Für die Berechnung des  $\Delta\Delta Ct$ -Wertes wurde der  $\Delta Ct$ -Wert der 3D-kultivierten Zellen vom  $\Delta Ct$ -Werte der 2D-kultivierten Zellen subtrahiert:

$$\Delta\Delta Ct(\text{Zielgen}) = \Delta Ct(\text{Zielgen}, 3D\text{-kultiviert}) - \Delta Ct(\text{Zielgen}, 2D\text{-kultiviert}).$$

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Werte wurde der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert gebildet, der den prozentualen Unterschied der Genexpression eines bestimmten Zielgenes zwischen den Kultivierungsbedingungen darstellt.

#### 5.2.4.6 RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array

Um die Änderung der Genexpression durch die Kultivierung im großen Maßstab zu analysieren, wurde der „PAHS-013Z RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules“ (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Auftragung der

Primer ist in Abbildung 40 dargestellt.

Für einen Array wurde ein Mastermix hergestellt der aus 1,35 ml *RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX qPCR* Mastermix (Qiagen), 102 µl cDNA-Lösung und 1,248 ml RNase-freiem Wasser bestand. Dieser wurde gut gemischt und je 25 µl pro Well zu den vorgelegten Primerpaaren pipettiert. Die Array-Platte wurde mit *Optical Thin-Wall 8-Cap Strips* (Qiagen) verschlossen, bevor die Primer mit dem Mastermix durch leichtes Schütteln gemischt wurden. Um die Reaktionslösung im Well zu konzentrieren und um Luftblasen zu entfernen wurde die Array-Platte für 1 min bei 1.000 x g zentrifugiert.

Die Amplifikation der DNA wurde im *Stratagene Mx3005P qPCR* System (Agilent) mit folgendem Programm durchgeführt:

<b>qRT-PCR Programm (<i>RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array</i>)</b>		
<b>Denaturierung</b>	95 °C	10 min
<b>Amplifikation</b>	95 °C	15 sec
	60 °C	1 min
		} 40x
<b>Dissoziationskurve</b>	95 °C	1 min
	55 °C	30 sec
	55-95 °C	

Um die Arrays der unterschiedlich kultivierten Proben vergleichen zu können, wurde der Schwellenwert für alle Arrays derselben Zelllinie auf denselben Wert gesetzt. Die anschließende Analyse erfolgte mit der Online-Auswertungssoftware im *Data Analysis Center* von Qiagen (<https://www.qiagen.com/de/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/?akamai-feo=off>).

Nach dem Hochladen der Daten wurden im „*Sample Manager*“ den Proben Gruppen zugewiesen (2D-kultivierte Zellen: Control; 3D-Matrigel-kultivierte Zellen: Group 1; 3D-Kollagen I-kultivierte Zellen: Group 2). Im Reiter „*Data QC*“ wurden die Qualitätskontrollen ausgewertet, die die PCR Array-Reproduzierbarkeit und eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA dokumentieren. Für die Normalisierung der Daten wurde das arithmetische Mittel der beiden Referenzgene GAPDH und B2M verwendet.

Im Rahmen der weiteren Analyse wurde eine *Heatmap* (Clustergramm) aller 87 analysierten Gene durch Clusteranalyse (*non-supervised hierarchical clustering*) generiert. Hierfür wurde das Ausmaß der Genexpression bestimmt, indem der  $2^{-\Delta Ct}$ -Wert für jedes individuelle Gen berechnet und auf den Mittelwert der  $2^{-\Delta Ct}$ -Werte aller Gene über alle Arrays normalisiert wurde. Dieser Wert wurde in der Abbildung als Farbcode dargestellt.

Es wurden Gene identifiziert, die verglichen mit den 2D-kultivierten Zellen mindestens eine doppelt so hohe oder halb so große Expression aufwiesen. Die durch die beiden 3D-

Kultivierungen regulierten Gene wurden miteinander verglichen, um gemeinsam regulierte Gene zu identifizieren.

#### 5.2.4.7 Re-Transformation und Kultivierung von Bakterien

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde diese in den kompetenten Bakterienstamm *TOP10f* transformiert. Dafür wurden pro Transfektionsansatz 200 µl selbst hergestellte kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 0,5-1 µl der Plasmid-Lösung und 100 µl kaltem TCM-Puffer versetzt. Nachdem die Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert wurden, wurde die Membran durch einen Hitzeschock für 3 min bei 42 °C permeabilisiert, wobei die DNA von den Bakterien aufgenommen wurde. Durch die sofortige, 1-minütige Inkubation auf Eis wurde dieser Vorgang gestoppt. Die Bakterien erholten sich durch die Zugabe von 700 µl LB-Medium (Raumtemperatur), während sie für 45 min bei 37 °C und 300 rpm auf dem Thermoblock inkubierten. Anschließend wurden 150 µl des Ansatzes auf einer Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platte steril mit einem Drigalskispatel ausgestrichen. Die Platte inkubierte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank, wobei sich Bakterienkolonien ausbildeten.

Für eine Plasmid-Vervielfältigung nach einer Re-Transformation wurde eine Bakterienkolonie für ca. 4-8 h in Antibiotika-haltigem LB-Flüssigmedium bei 37 °C im Bakterien-schüttler kultiviert. Diese Suspensionskultur wurde in 100 ml Antibiotika-haltigem LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C im Bakterien-schüttler inkubiert, wo sie sich weiter vermehrten.

##### TCM-Puffer (in H<sub>2</sub>O):

10 mM Tris-HCl pH 7,5

10 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM MgCl<sub>2</sub>

##### LB-Agar-Medium (in H<sub>2</sub>O):

1 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

1,5 % Agar in LB-Medium

##### LB-Flüssigmedium (in H<sub>2</sub>O):

1 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

#### 5.2.4.8 MIDI Plasmid Präparation

Nach der Vermehrung der Plasmid-DNA in der Bakterien-Suspensionkultur, wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien mithilfe des DNA-midi *GT Plasmid DNA Purification Kits* (iNtRON Biotechnology) nach Herstellerangaben isoliert.

Die eluierte Plasmid-DNA wurde mithilfe des NucleoBond *Finalizer Kits* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufkonzentriert. Hierfür wurde das Eluat mit 5,6 ml Isopropanol versetzt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde die NucleoBond Finalizer-Membran getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in

200 µl TE-Puffer nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur eluiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mithilfe des NanoDrop 1000 (siehe 5.2.4.2) bestimmt.

TE-Puffer pH 8,0 (in H<sub>2</sub>O):

10 mM Tris-HCl pH 8,0

1 mM EDTA pH 8,0

#### **5.2.4.9 Restriktionsverdau**

Um zu überprüfen, ob von den Bakterien das richtige Plasmid aufgenommen und vermehrt wurde, wurde das Plasmid mit einem Plasmid-spezifischen Restriktionsverdau überprüft. Dabei stehen verschiedene Kombinationen aus Restriktionsendonukleasen zur Verfügung, die die Plasmid-DNA in Fragmente mit spezifischer Größe spalten.

Dabei wurde 1 µg der Plasmid-DNA im Restriktionsverdau eingesetzt. Sie wurde mit 1 µl des 10x Restriktionspuffers und 0,5-1 µl der entsprechenden Restriktionsendonuklease (10-20 U/ml) gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 5.2.4.4) und mit den zu erwartenden Fragment-Größen verglichen.

#### **5.2.5 Statistische Analyse**

Sofern nicht anders angegeben, wurden für jedes Experiment drei unabhängige Versuche durchgeführt. Aus den Einzelwerten wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung bestimmt und im jeweiligen Diagramm dargestellt.

Die Analyse der statistischen Signifikanz erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 5.03. Dabei wurde je nach Fragestellung entweder eine one-way ANOVA mit einem Dunnett's (Vergleich mit der Kontrollgruppe) bzw. einem Tukey's (Vergleich aller Gruppen) Posttest oder eine two-way ANOVA mit einem Bonferroni (Vergleich mit Kontrollgruppe) Posttest durchgeführt.

Die statistische Signifikanz wurde dabei entsprechend dem Signifikanzniveau  $\alpha$  eingeteilt, wobei \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$  und \*\*\*:  $p < 0,005$  entspricht.

## 6 Ergebnis

### 6.1 EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 beeinflussen die MAPK-Aktivität in HEK293-Zellen

Analysen, die die Effekte von Rac1 in der Tumorentwicklung beschreiben, unterscheiden aufgrund der starken Sequenzübereinstimmung nicht immer zwischen den beiden Isoformen Rac1 und Rac1b. Im Rahmen dieser Arbeit sollen Rac1b-spezifische Funktionen in der Entstehung und Entwicklung von Lungentumoren untersucht werden, die sich vor allem von den teilweise bekannten, Rac1-induzierten Effekten unterscheiden.

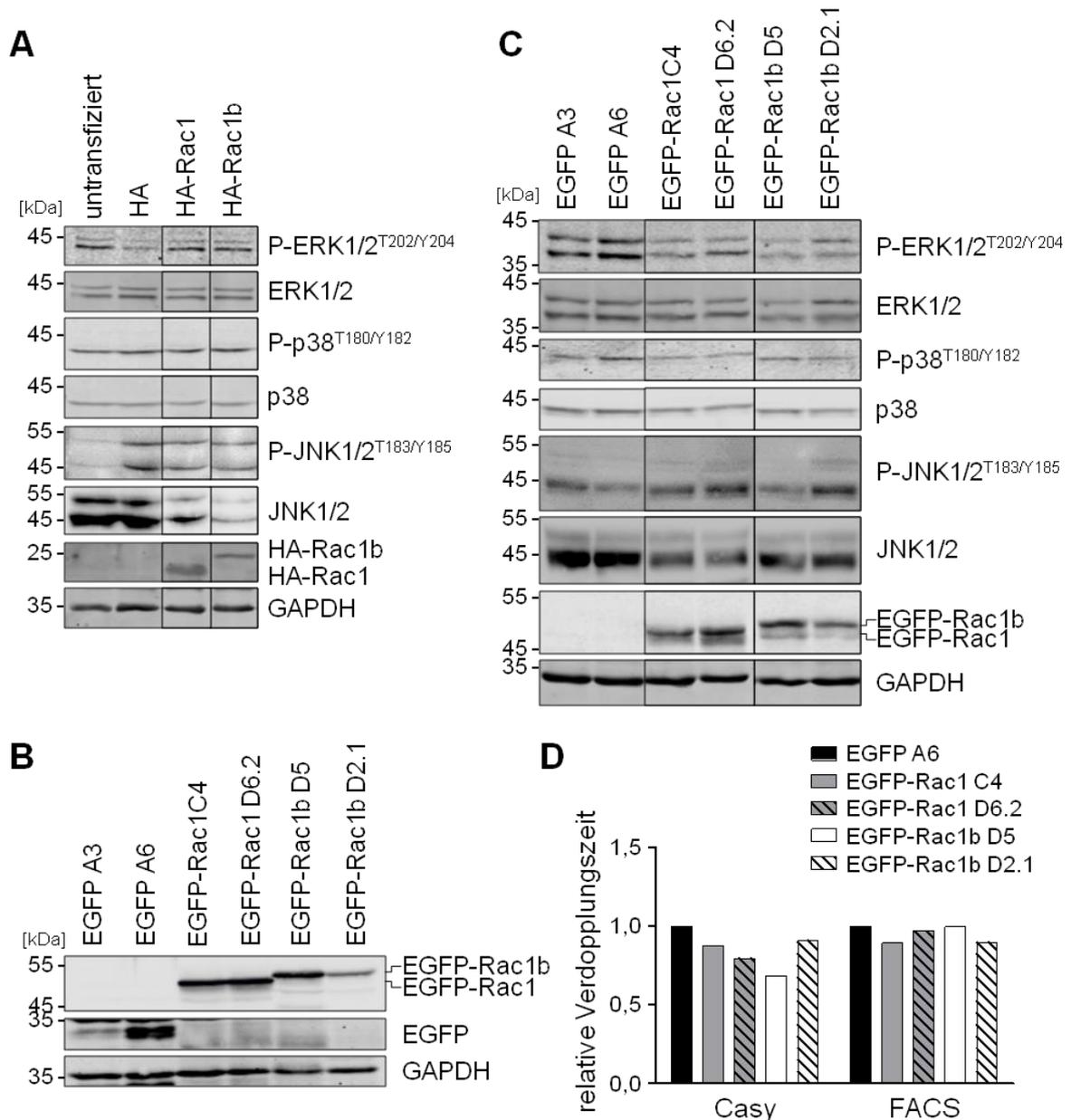
Daher wurden zunächst in Vorversuchen die Effekte der kurzzeitigen Expression von HA-Rac1b bzw. HA-Rac1 auf die Aktivität der MAPK-Signaltransduktion untersucht. In den proteinbiochemischen Analysen wurden dabei spezifische Phosphorylierungsstellen der verschiedenen MAPKs untersucht, die mit einer Aktivierung der entsprechenden Kinasen in Verbindung stehen.

In HEK293-Zellen war phosphoryliertes ERK1/2 in beiden Experimenten nur schwer nachweisbar, wobei in dieser Zelllinie generell mehr ERK2 als ERK1 phosphoryliert vorliegt. Durch die Transfektion mit dem HA-kodierenden Leervektor wurde die Aktivität beider ERK-Isoformen reduziert verglichen mit den untransfizierten HEK293-Zellen. Durch die transiente Expression von EGFP-Rac1b bzw. EGFP-Rac1 wurde dieser inhibierende Effekt auf die Aktivität von ERK1/2 nicht nachgewiesen und die ERK1/2-Aktivität entsprach der in untransfizierten HEK293-Zellen (Abbildung 16A).

Für die MAPK p38 wurden weder eine Änderung in der Aktivität noch der Gesamtproteinmenge durch die kurzzeitige Expression von HA-Rac1b oder HA-Rac1 nachgewiesen (Abbildung 16A).

Eine Analyse der Aktivität der MAPKs JNK1/2 zeigte, dass die Transfektion mit dem HA-kodierenden Leervektor zu einer Aktivierung dieser MAPKs führte, die durch die zusätzliche Expression von HA-Rac1b bzw. HA-Rac1 nicht verändert wurde. Beide HA-Rac-Isoformen bewirkten dagegen eine Reduktion der JNK1/2-Gesamtproteinmenge, die in den HA-Rac1b-exprimierenden HEK293-Zellen stärker ausfielen, als in den HA-Rac1-exprimierenden Zellen (Abbildung 16A).

In humanen Tumoren wird Rac1 bzw. Rac1b kontinuierlich über einen langen Zeitraum überexprimiert. Um diese langanhaltende Überexpression der beiden Rac-Isoformen besser nachstellen zu können, wurden von L. Scharlibbe in unserem Labor HEK293-Zellen generiert, die stabil EGFP, EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b exprimierten. Je zwei Zellklone pro Konstrukt wurden für die folgenden Versuche analysiert. Eine Überprüfung der Expression des EGFP-Rac-Fusionsproteins zeigte eine vergleichbare EGFP-Rac-Proteinmenge in den stabil EGFP-Rac1-exprimierenden HEK293-Klonen C4 und D6.2 und



**Abbildung 16: Effekte der Rac1b- und Rac1-Expression in HEK293-Zellen.**

**[A]** HA-Rac1 und HA-Rac1b wurden in HEK293-Zellen für 24 h exprimiert und die Effekte auf die Aktivität der MAPKs analysiert. Beide Rac-Isoformen führten zu einer Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung und einer Abnahme der JNK1/2-Proteinmenge. **[B]** Es wurden HEK293-Zellklone hergestellt, die EGFP, EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b stabil exprimierten und in ähnlichen Mengen aufwiesen. Eine Ausnahme bildeten der EGFP-Klon A3 und der EGFP-Rac1b-Klon D2.1, bei denen reduzierte EGFP- und EGFP-Rac1b-Mengen nachgewiesen wurden. **[C]** Die Effekte von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 auf die Aktivität der MAPKs wurde in stabil EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-exprimierenden HEK293-Klonen analysiert, wobei eine reduzierte ERK1/2-Aktivität festgestellt wurde. **[A-C]** Die Proben wurden mit einem Western Blot analysiert, aber in veränderter Reihenfolge abgebildet (schwarze Kästen). Es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt. Die GAPDH-Färbung diente in allen Abbildungen als Beladungskontrolle. **[D]** Die Verdopplungszeit der stabil EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-exprimierenden HEK293-Zellen wurde mit zwei verschiedenen, automatisierten Zählmethoden analysiert. Die Messung der Gesamtzellzahl mit dem *Casy Cell Counter TTC* zeigte sowohl durch die EGFP-Rac1b- als auch die EGFP-Rac1-Expression eine verringerte Verdopplungszeit. Die automatische Zellzählung mit dem *FACS Canto II*, bei der nur die grün-fluoreszierenden, EGFP-Rac-exprimierenden Zellen analysiert wurden, wies keinen Unterschied in den Verdopplungszeiten der Klone nach.

dem EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellklon D5. Der zweite, stabil EGFP-Rac1b-exprimierende Zellklon D2.1 zeigte dagegen eine um etwa die Hälfte reduzierte EGFP-Rac1b-Proteinmenge (Abbildung 16B).

Für einen Vergleich der kurzzeitigen mit der langfristigen Expression von Rac1b bzw. Rac1 wurden stabil EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-exprimierenden HEK293-Zellen ebenfalls auf Veränderungen in der Aktivität der MAPKs analysiert. Die Expression von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 reduzierte die ERK1/2-Phosphorylierung verglichen mit den EGFP-exprimierenden Kontrollzellen. Die Gesamtproteinmenge wurde durch keine der beiden Rac-Isoformen beeinflusst (Abbildung 16C).

Die Phosphorylierung von p38 und JNK1/2 wurde durch die stabile Expression von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 in den HEK293-Zellen nicht verändert (Abbildung 16C). Die Reduktion der JNK1/2-Proteinmenge wurde nicht nur in den transient sondern auch in den stabil EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-exprimierenden HEK293-Zellen nachgewiesen (Abbildung 16C). Bezogen auf die zelluläre JNK1/2-Menge ist damit die absolute Menge an phosphoryliertem JNK1/2 durch EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 größer geworden, was in einer erhöhten Gesamtaktivierung des JNK1/2-Signalweges resultieren kann.

Des Weiteren wurden die langfristigen Effekte von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 auf die Proliferation in HEK293-Zellen untersucht. Hierfür wurde die Zellzahl alle 24 h über einen Zeitraum von vier Tagen mit zwei verschiedenen Methoden gezählt und daraus die Verdopplungszeit berechnet. Bei der automatisierten Zellzählung mit dem *Casy Cell Counter TTC*, bei der sowohl die transfizierten als auch die nicht-transfizierten Zellen gezählt wurden, wurde eine schwache Reduktion in der Verdopplungszeit der stabil EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden HEK293-Zellen beobachtet. Die automatisierte Zellzählung mithilfe des *FACS Canto II*, bei der ausschließlich die grün-fluoreszierenden, EGFP- bzw. EGFP-Rac-exprimierenden Zellen ausgewertet wurden, wies keine Änderungen in der Verdopplungszeit der EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden HEK293-Zellen gegenüber den EGFP-exprimierenden Kontrollklonen nach (Abbildung 16D).

In HEK293-Zellen wurde hier gezeigt, dass die beiden Rac-Isoformen die Aktivität der MAPKs ERK1/2 je nach Expressionsdauer unterschiedlich beeinflussten: Die kurzzeitige Expression von HA-Rac1b und HA-Rac1 führte zu einer Steigerung der ERK1/2-Aktivität gegenüber den HA-exprimierenden HEK293Zellen, während die langfristige Expression der EGFP-Rac-Isoformen die ERK1/2-Aktivität inhibierte.

Der Anteil an aktiviertem JNK1/2 wurde unabhängig von der Expressionsdauer von Rac1b und Rac1 in ähnlichem Ausmaß erhöht.

Diese reduzierte ERK1/2- und erhöhte JNK1/2-Aktivität bewirkte allerdings keine Änderung

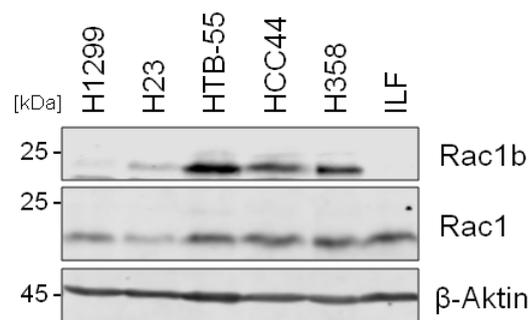
der Proliferationsrate der stabil EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-exprimierenden HEK293-Zellen.

## 6.2 Endogene Expression von Rac1b und Rac1 in humanen NSCLC-Zelllinien

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem Rac1b- und Rac1-Proteingehalt und den zellulären Proliferations- und Migrationseigenschaften für Lungenkarzinom-Zellen herstellen zu können, wurde die Proteinmenge der beiden Rho-GTPasen in fünf humanen NSCLC-Zelllinien (H1299, H23, HTB-55, HCC44 und H358) und einer humanen Lungenfibroblasten-Zelllinie (interstitielle Lungenfibroblasten, ILF) genauer analysiert.

Bei der Rac1b-Proteinkonzentration sind deutliche Unterschiede sichtbar: Für die Fibroblastenzelllinie ILF und die de-differenzierten, spindelförmigen NSCLC-Zelllinien H1299 und H23 ist kein oder nur sehr wenig endogenes Rac1b nachweisbar. Die differenzierten, kopfsteinpflasterartig-wachsenden NSCLC-Zelllinien H358, HCC44 und HTB-55 synthetisierten dagegen deutlich größere Mengen an Rac1b.

Die Rac1-Proteinkonzentration wurde in allen analysierten Lungenzelllinien mit ähnlichen Mengen nachgewiesen, wobei H23-Zellen die geringste Rac1-Proteinmenge aufwiesen.



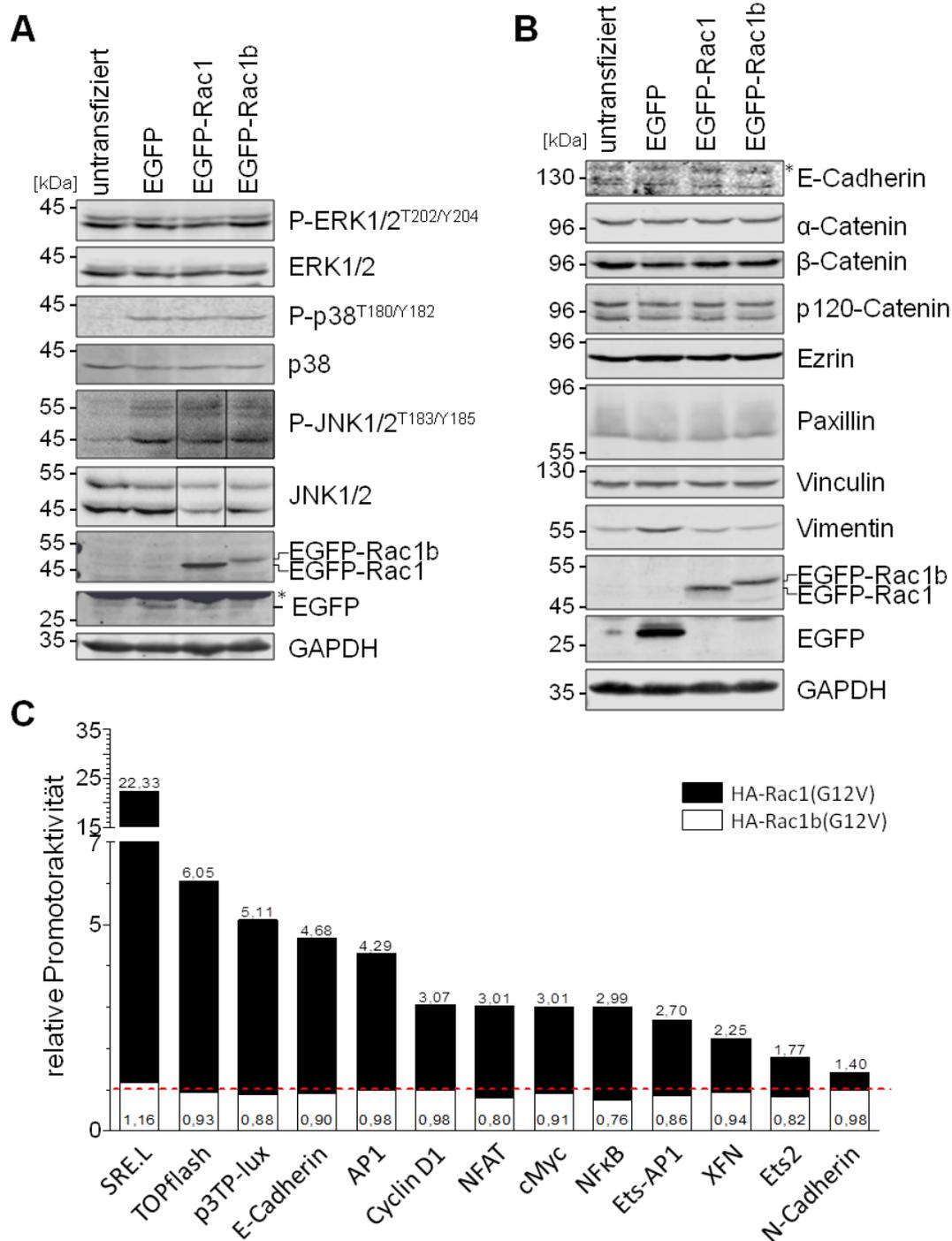
**Abbildung 17: Endogene Expression von Rac1b und Rac1 in verschiedenen NSCLC-Zelllinien.**

Die Analyse fünf verschiedener NSCLC- und einer Lungenfibroblasten (ILF)-Zelllinie zeigte eine vergleichbare Proteinkonzentration von Rac1 in allen analysierten Zelllinien. Rac1b wurde Zelllinien-spezifisch exprimiert, wobei in den ILF und H1299 kein und in H23 nur sehr geringe Mengen Rac1b nachgewiesen wurden. Die größte Rac1b-Proteinmenge zeigte die Zelllinie HTB-55. Die  $\beta$ -Aktin-Färbung diente als Beladungskontrolle. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt.

## 6.3 Rac-induzierte Regulation des Differenzierungsstatus und der Gentranskription

Für die Analyse der Rac1b-spezifischen Funktionen in der Entstehung und Entwicklung von humanen Lungentumoren wurde die NSCLC-Zelllinie H23 aufgrund ihrer geringen endogenen Rac1b-Proteinmenge ausgewählt (Abbildung 17). Wie bereits in den Vorversuchen mit HEK293-Zellen wurden die Effekte der transienten Expression von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 auf die Aktivität der MAPKs in H23-Zellen untersucht.

Im Gegensatz zu den HEK293-Zellen bewirkte die kurzzeitige Expression von EGFP-Rac1b



**Abbildung 18: Effekte der transienten Expression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b in H23-Zellen.**

**[A]** EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b wurde für 24 h in H23-Zellen exprimiert und die Effekte auf die Aktivität der MAPKs untersucht. Dabei wurde eine Transfektions-bedingte Phosphorylierung der Stress-induzierten Kinasen p38- und JNK1/2 detektiert, die durch EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b nicht verändert wurden. Die JNK1/2-Gesamtproteinmenge nahm jedoch sowohl durch EGFP-Rac1b als auch EGFP-Rac1 ab. \* GAPDH-Bande aus einer vorherigen Färbung. **[B]** In H23-Zellen, die transient EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b exprimierten, wurden verschiedene Differenzierungsmarker untersucht. Die Vimentin-Banden wurden durch beide EGFP-Rac-Isoformen reduziert. \* unspezifische Bande. **[A, B]** In diesen Versuchen diente die GAPDH-Färbung als Beladungskontrolle. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt. **[C]** H23-Zellen wurden mit konstitutiv-aktivem HA-Rac1(G12V) bzw. konstitutiv-aktivem HA-Rac1b(G12V) transfiziert und auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung verschiedener Promotorkonstrukte untersucht. Dabei bewirkte aktiviertes HA-Rac1(G12V) bei einigen Promotoren eine deutliche Aktivierung, während HA-Rac1b(G12V) keine der Promotorkonstrukte aktivierte. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Luciferase-Aktivität der Leervektor-transfizierten Proben normiert. Im Graphen ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die rote Linie markiert eine relative Promotoraktivität von 1.

und EGFP-Rac1 in den H23-Zellen keine Änderung in der ERK1/2-Aktivität (Abbildung 18A). Eine Analyse der Stress-induzierten MAPKs p38 und JNK1/2 zeigten dagegen bereits durch die Transfektion des Ausgangsvektors pEGFP eine Aktivitätszunahme, die durch keine der beiden EGFP-Rac-Isoformen weiter beeinflusst wurde. Die transiente EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-Expression reduzierten die Gesamtproteinmenge von JNK1/2 und führen damit zu einer Rac-abhängigen Erhöhung des aktiven Anteils von JNK1/2, wie es schon in HEK293-Zellen gezeigt werden konnte (Abbildung 16, Abbildung 18A).

Für Rac1 wurde in mehreren Studien eine EMT-induzierende Rolle beschrieben. Daher wurden im Folgenden Rac1b-induzierte Änderungen des Differenzierungsstatus der H23-Zellen untersucht. Für die Analyse des epithelialen Phänotyps wurden spezifische, epitheliale Differenzierungsmarker (E-Cadherin,  $\alpha$ -Catenin) untersucht sowie weitere Proteine, die an der Cadherin-vermittelten Adhäsion beteiligt sind ( $\beta$ -Catenin, p120-Catenin, Vinculin). Der mesenchymale Phänotyp wurde über den mesenchymalen Differenzierungsmarker Vimentin definiert, sowie durch Änderungen der Integrin-vermittelten Zell/Matrix-Kontakte (Ezrin, Paxillin, Vinculin).

In H23-Zellen wurden nur sehr geringe Mengen an E-Cadherin nachgewiesen, die wie  $\alpha$ -,  $\beta$ - und p120-Catenin durch das Vorhandensein von EGFP-Rac1b oder EGFP-Rac1 nicht verändert wurden (Abbildung 18B).

Ezrin, Paxillin und Vinculin, die an der Ausbildung von Zell/Matrix-Kontakten beteiligt sind, wurden durch die stabile Expression eines der beiden EGFP-Rac-Proteine ebenfalls nicht beeinflusst. Durch die Transfektion mit dem EGFP-kodierenden Ausgangsvektor wurde die Gesamtproteinmenge von Vimentin deutlich erhöht. Dieser Effekt wurde durch die transiente Expression von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 aufgehoben, sodass sie verglichen mit den transfizierten Kontrollzellen, aber nicht im Vergleich mit den Ausgangszellen, eine reduzierte Vimentin-Proteinmenge aufwiesen (Abbildung 18B). Dieser Effekt wurde in zwei von drei Experimenten gezeigt. Im dritten Versuch induzierte weder EGFP, noch eine der beiden EGFP-Rac-Isoformen eine Änderung der Vimentin-Proteinmenge (Daten nicht gezeigt).

Eine Rolle von Rac1 in der Genregulation wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, während für die transkriptionelle Regulation durch Rac1b kaum Daten vorliegen. Um eine Rolle von Rac1b in der Genregulation genauer zu überprüfen, wurden H23-Zellen mit einer konstitutiv-aktiven Mutante von HA-Rac1b bzw. HA-Rac1 (HA-Rac1b(G12V) bzw. HA-Rac1(G12V)) transfiziert und die Aktivierung verschiedener Promotoren mittels Genreporter-Assays untersucht.

Konstitutiv-aktives HA-Rac1b(G12V) bewirkte für keine der analysierten Promotoren eine signifikante Aktivierung (Abbildung 18C), auch nicht für den Rac1-induzierbaren Promotor SRE.L (*serum response element*, SRF-induziertes Reporterkonstrukt). Bei diesem SRE.L-

Promotorkonstrukt handelt es sich um einen Promotor, dessen Aktivierbarkeit durch Rac1 in der Literatur schon mehrfach beschrieben wurde und in dieser Arbeit als Positivkontrolle diente, um die Funktionalität des Genreporter-Assays zu belegen (Abbildung 18C).

Außerdem wurden weitere Reporterkonstrukte durch konstitutiv-aktives HA-Rac1(G12V) induziert, darunter TOPflash ( $\beta$ -Catenin-Lef1/TCF-induziertes Reporterkonstrukt) und p3TP-lux (TGF $\beta$ -induziertes *Smad binding element*) (Abbildung 18C).

#### **6.4 Charakterisierung von stabil EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellen**

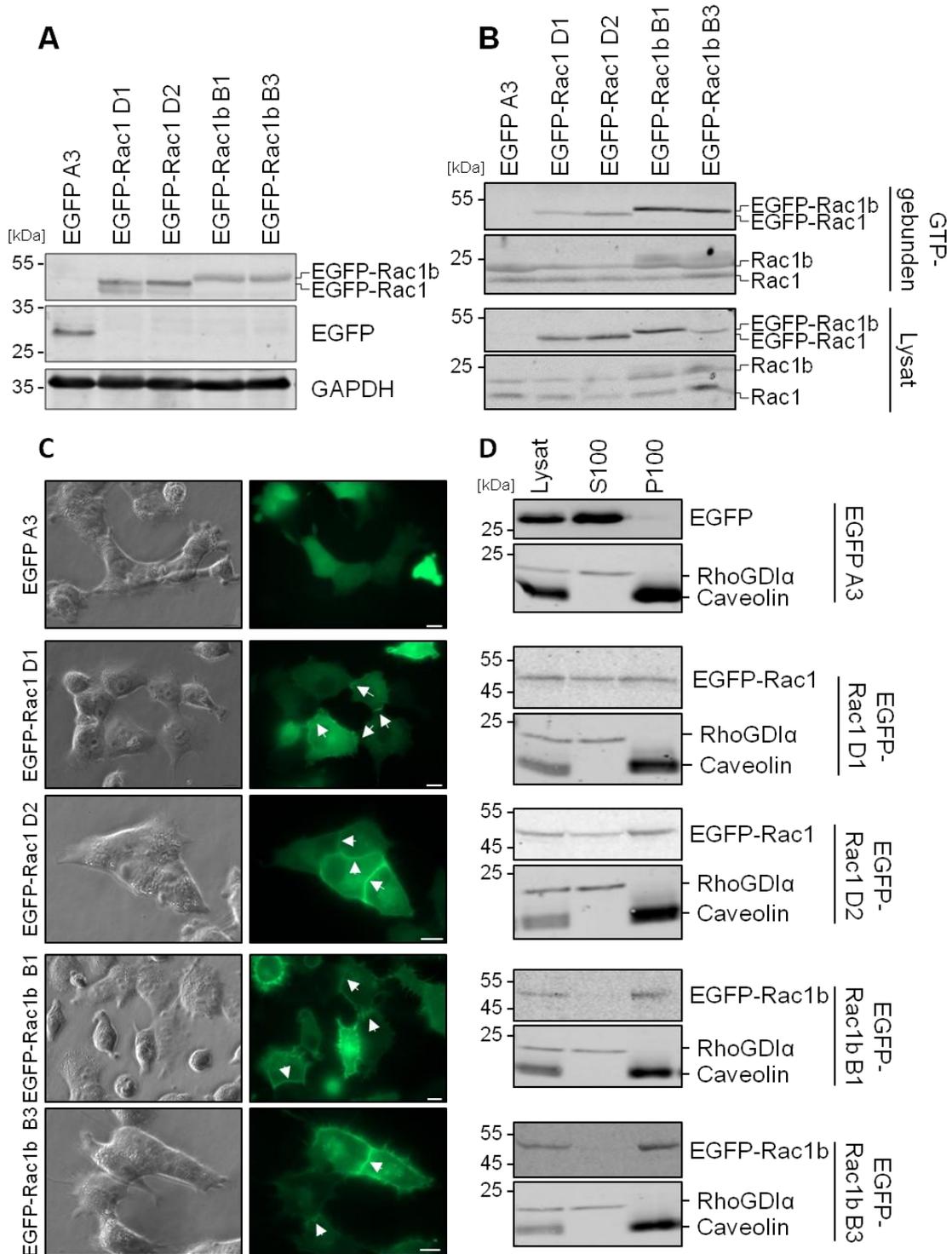
Um die Effekte der langfristigen Rac1b- bzw. Rac1-Expression in H23-Zellen zu analysieren, wurden H23-Zellen in Zusammenarbeit mit D. Lohfink in unserem Labor mit pEGFP, pEGFP-Rac1 bzw. pEGFP-Rac1b transfiziert und für eine stabile Expression selektioniert. Je zwei Zellklone pro Konstrukt wurden für die weiteren Analysen verwendet. Dabei wurde zunächst die EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-Proteinkonzentration überprüft, die in allen H23-Zellklonen vergleichbar stark ausfiel (Abbildung 19A).

Außerdem wurde die Aktivität der beiden EGFP-Rac-Konstrukte bestimmt. Hierbei wurden in Zusammenarbeit mit M. Heipel (AG Giehl, Justus-Liebig-Universität Gießen) Rac-Aktivitätsassays durchgeführt, bei denen aktives, GTP-gebundenes EGFP-Rac1b bzw. EGFP-Rac1 spezifisch über PAK-GST-*Beads* aus einem Proteinlysate isoliert wurde. Dabei war bei gleichen eingesetzten Proteinnengen (Lysat, Abbildung 19B) mehr EGFP-Rac1b als EGFP-Rac1 an die PAK-GST-*Beads* gebunden. Somit lag ein großer Teil von EGFP-Rac1b in der aktivierten, GTP-gebundenen Form vor, während EGFP-Rac1 einen geringeren Anteil an aktiviertem, GTP-gebundenen Protein aufwies (Abbildung 19B).

Für die weitere Charakterisierung der stabil EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klone wurde die Lokalisation der EGFP-Rac-Proteine in den Zellen analysiert. Hierfür wurde die EGFP-Lokalisation der Fusionsproteine unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert.

In beiden stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Klonen ist eine deutliche Lokalisation an der gesamten Zellmembran detektierbar, die sich nicht nur auf die Bereiche von Zell/Zell-Kontakten beschränkte (Pfeile, Abbildung 19C). Im Zytosol wurde dagegen nur ein geringer Anteil des EGFP-Rac1b-Proteins nachgewiesen (Abbildung 19C).

Dies wurde weiter durch eine Membran/Zytosol-Fraktionierung von Zelllysaten in Zusammenarbeit mit J. Klinke (AG Giehl, Justus-Liebig-Universität Gießen) verifiziert. Mit dieser Methode wurden über mehrere Zentrifugationsschritte Proteine angereichert, die entweder im Zytosol (S100, *soluble*) oder in der Membran (P100, *particular*) lokalisiert sind. Dabei wurde EGFP-Rac1b nur in der Membran-angereicherten P100-Fraktion nachgewiesen (Abbildung 19C).



**Abbildung 19: Charakterisierung der stabil EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klone.**

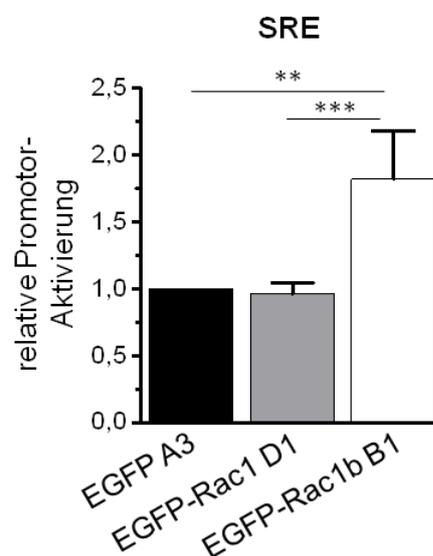
**[A]** Die Proteinkonzentrationen von EGFP, EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b sind in allen H23-Klonen ähnlich stark. Die GAPDH-Färbung diente als Beladungskontrolle. Es wurde ein repräsentativer Blot dargestellt. **[B]** In Rac-Aktivitätsassays wurde mehr GTP-gebundenes EGFP-Rac1b als EGFP-Rac1 aus den Lysaten isoliert. Es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt. **[C, D]** Die Lokalisation von EGFP, EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b in den stabil exprimierenden H23-Klonen wurde mittels **[C]** Lebendzellanalyse und **[D]** Membran/Zytosol-Fraktionierung analysiert. Dabei wurde mit beiden Methoden nachgewiesen, dass EGFP-Rac1b hauptsächlich an der Zellmembran lokalisiert ist und EGFP-Rac1 sowohl im Zytosol als auch an Membranen detektiert wurde. Der Maßstabsbalken in **[C]** entspricht einer Länge von 10  $\mu\text{m}$ . Als Marker dienten in der Membran/Zytosol-Fraktionierung RhoGDI $\alpha$  für die Cytosol-angereicherte und Caveolin für die Membran-angereicherte Fraktion. Es wurden **[C]** drei bzw. **[D]** zwei unabhängige Experimente durchgeführt und repräsentative Bilder bzw. Blots dargestellt.

Die intrazelluläre EGFP-Rac1-Verteilung in den beiden H23-Klonen D1 und D2 unterschied sich von den stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Klonen. EGFP-Rac1 ist hier hauptsächlich im Bereich von Zell/Zell-Kontakten an der Membran lokalisiert (Pfeile, Abbildung 19C), und der Großteil des EGFP-Rac1-Proteins befindet sich im Zytosol (Abbildung 19C).

Diese Proteinverteilung wurde ebenfalls in der Membran/Zytosol-Fraktionierung nachgewiesen, bei der EGFP-Rac1 gleichermaßen in der zytosolischen S100- und der membranären P100-Fraktion nachgewiesen wurde (Abbildung 19D).

Für den stabil EGFP-exprimierenden Klon A3 wurde unter dem Mikroskop eine gleichmäßige zytosolische und nukleäre Verteilung des EGFP-Proteins nachgewiesen (Abbildung 19C). Dies wurde durch Membran/Zytosol-Fraktionierungsversuche unterstützt, wobei eine zytosolische EGFP-Lokalisation in der S100-Fraktion nachgewiesen wurde (Abbildung 19D). Da nur aktives, GTP-gebundenes Rac-Protein an der Membran lokalisiert ist, unterstützen diese Proteinlokalisations-Analysen die Ergebnisse der Aktivitätsassays (Abbildung 19B), bei denen EGFP-Rac1b eine höhere Aktivität aufweist als EGFP-Rac1 und hauptsächlich in der aktivierten, Membran-gebundenen Form vorliegt.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die lang andauernde EGFP-Rac1b-Expression die Fähigkeit der Promotoraktivierung in den H23-Klonen verändern kann. Hierfür wurde beispielhaft das SRE.L-Promotorkonstrukt untersucht, das, wie schon in Kapitel 6.3 beschrieben, eine gut charakterisierte Rac1-induzierbare Zielsequenz enthält.



**Abbildung 20: SRE.L-Promotoraktivierung in stabil EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klonen.**

Die Genreporter-Assays zeigten eine Aktivierung des SRE.L-Promotorkonstrukts im stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellklon B1, aber nicht im stabil EGFP-Rac1-exprimierenden Zellklon D1. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt, bei denen die Luciferase-Aktivitäten auf die des EGFP A3-Zellklons normiert wurden. Im Graphen wurde der Mittelwert +/- SD dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde eine one-way ANOVA mit einem Tukey's-Posttest durchgeführt. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

Dazu wurden die Klone EGFP A3, EGFP-Rac1 D1 und EGFP-Rac1b B1 mit dem SRE.L-Promotorkonstrukt transfiziert. Um zu kontrollieren, ob das Promotorkonstrukt von den EGFP-Rac-exprimierenden Zellen aufgenommen wurde, wurde zuvor der Anteil der grün fluoreszierenden und damit EGFP-Rac-exprimierenden Zellen bestimmt. Dieser lag bei den Klonen EGFP-Rac1 D1 und EGFP-Rac1b B1 bei über 90 % und bei dem Kontrollklon EGFP A3 bei 60-70 %. Gleichzeitig zeigten die gemessenen Renilla-Luciferase-Werte einen Wert von 20.000-50.000 RLU, was auf eine gute Transfektionseffizienz (> 25 %) mit dem Promotorkonstrukt schließen lässt. Man kann daher davon ausgehen, dass das Reporterkonstrukt von den EGFP-Rac-exprimierenden H23-Zellen aufgenommen wurde. Interessanterweise wurde im stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Klon B1 gegenüber den EGFP- und EGFP-Rac1-exprimierenden Klonen eine signifikante Verdopplung der SRE.L-Promotoraktivität nachgewiesen (Abbildung 20).

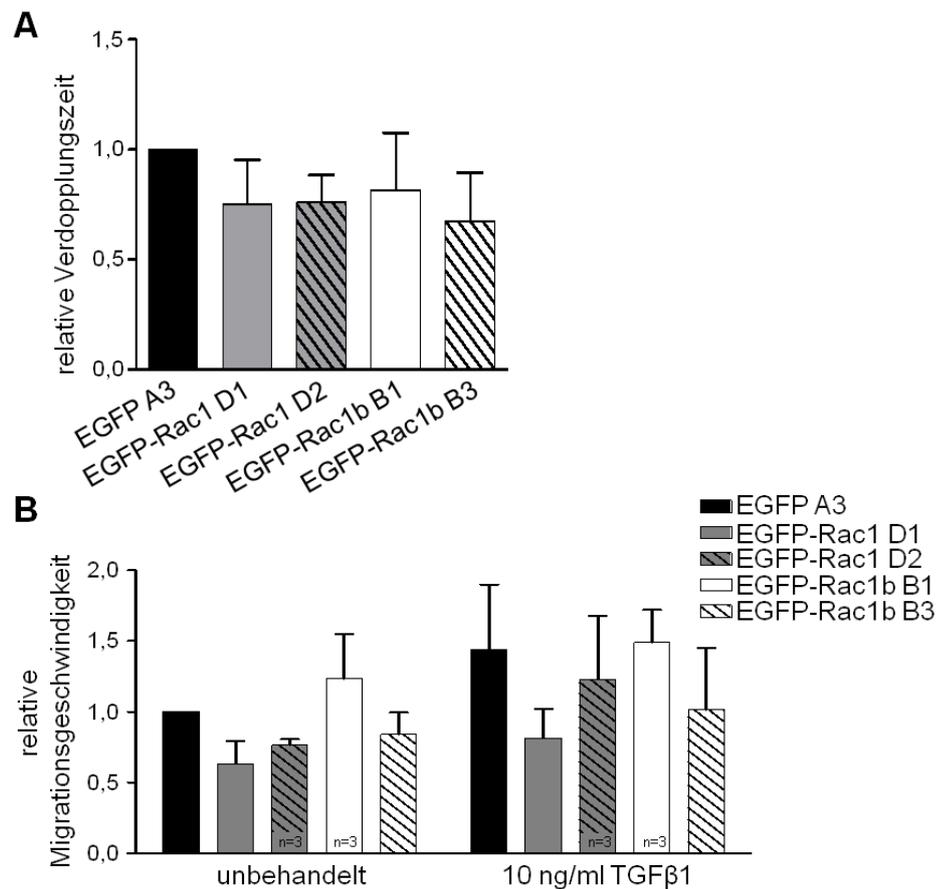
Die langfristige Expression von EGFP-Rac1 zeigte im Gegensatz zur kurzzeitigen Expression von konstitutiv-aktivem HA-Rac1(G12V) keine Aktivierung des SRE.L-Reporterkonstrukts (Abbildung 20).

## **6.5 Stabil exprimiertes EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 steigern die Proliferation**

Um einen Effekt der stabilen Expression von EGFP-Rac1b bzw. EGFP-Rac1 in H23-Zellen auf die Proliferationsgeschwindigkeit zu untersuchen, wurde mit den jeweiligen Zellen Impedanz-basierte Echtzeitmessungen (Xcelligence) für mindestens 72 h durchgeführt und daraus die relativen Verdopplungszeiten bestimmt. Der dabei beobachtete Effekt von EGFP-Rac1b bzw. EGFP-Rac1 auf die Verdopplungszeit ist sehr gering: Die langfristige Expression von EGFP-Rac1b sowie von EGFP-Rac1 bewirkten mit einer ca. 25 %igen Reduktion der Verdopplungszeit eine etwas erhöhte Proliferation verglichen mit den EGFP-exprimierenden Kontrollzellen (Abbildung 21A).

Für eine Analyse des Migrationsverhaltens dieser H23-Klone wurden Wundheilungsassays durchgeführt. Dabei wurde in 3 h-Abständen der Wundverschluss über einen Zeitraum von 50 h gemessen. Unter Serum-reduzierten Bedingungen (5 % FCS in DMEM) war der Einfluss von EGFP-Rac1b auf das Migrationsverhalten zwischen den beiden analysierten Zellklonen sehr heterogen. So bewirkte EGFP-Rac1b im Zellklon B1 einen Anstieg der Migrationsgeschwindigkeit um etwa 20 %, während im Zellklon B3 die Migration um 15-20 % reduziert war.

Die stabile Expression von EGFP-Rac1 bewirkte eine Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit um 25-35 %.



**Abbildung 21: EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-induzierte Effekte auf Proliferation und Migration in H23-Klonen.**

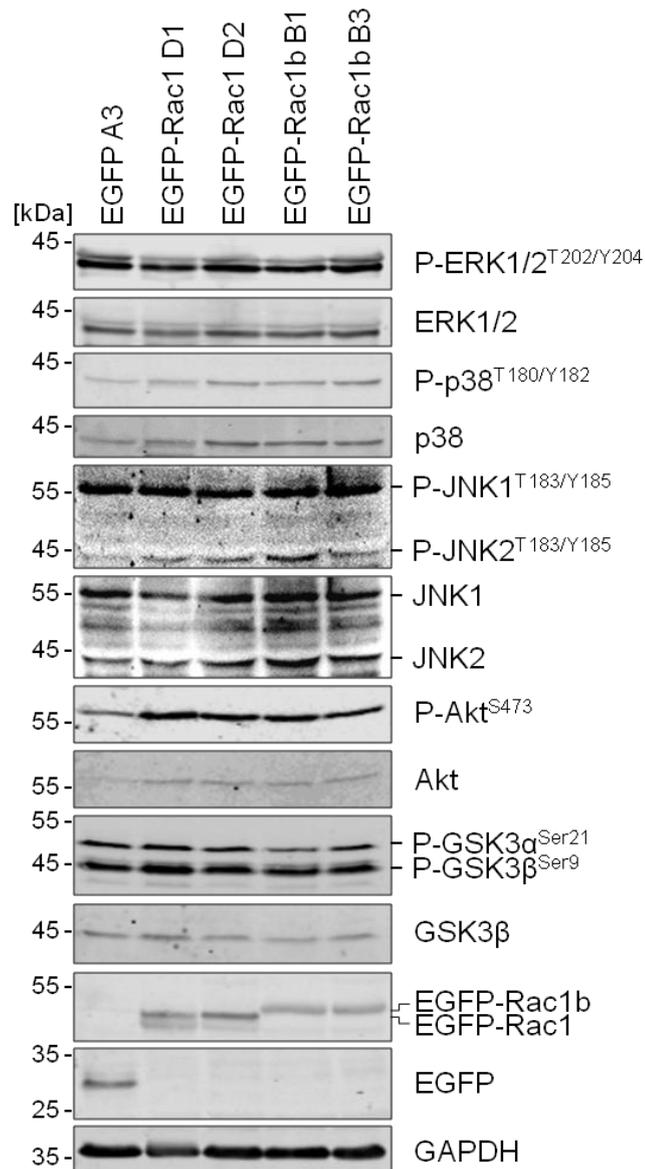
**[A]** Die Verdopplungszeiten der stabil exprimierenden H23-Klone wurden durch Impedanz-basierte Echtzeit-Messungen (XCelligence) bestimmt. Dabei wurden die Verdopplungszeiten durch die Expression von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 leicht reduziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der auf EGFP A3 normierten Verdopplungszeiten +/- SD aus fünf unabhängigen Experimenten. Für die statistische Auswertung wurde eine one-way ANOVA mit Dunnett's Posttest durchgeführt. Die EGFP-Rac1-induzierte Reduktion der Proliferationsrate war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,133$ ). **[B]** Für die Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit wurden mit den stabil EGFP-Rac-exprimierenden H23-Klonen Wundheilungsassays durchgeführt. EGFP-Rac1b beeinflusste die Migrationsgeschwindigkeit nicht, während EGFP-Rac1 eine 25-35 % reduzierte Migrationsgeschwindigkeit bewirkte. Eine Behandlung der Zellen mit 10 ng/ml TGFβ1 bewirkte einen generellen Anstieg der Migrationsgeschwindigkeiten. Es wurden, wenn nicht anders angegeben, vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die Migrationsgeschwindigkeit wurde auf den unbehandelten EGFP A3-Zellklon normiert und der Mittelwert +/- SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer two-way ANOVA und einem Bonferroni-Posttest. \*:  $p < 0,05$ .

Die Behandlung der H23-Zellen mit 10 ng/ml TGFβ1 resultierte in einem generellen Anstieg der Migrationsgeschwindigkeiten in allen analysierten Zellklonen. Die Migrationsgeschwindigkeit der EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen wurde durch die TGFβ1-Behandlung nicht beeinflusst und ist weiterhin vergleichbar mit den stabil EGFP-exprimierenden H23-Zellen (Abbildung 21B).

Der EGFP-Rac1-induzierte Effekt auf die Migrationsgeschwindigkeit wurde durch die TGFβ1-Behandlung nicht verändert und die EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen zeigten weiterhin eine Reduktion der Migrationsgeschwindigkeiten verglichen mit den korrespondierenden EGFP-exprimierenden H23-Zellen (Abbildung 21B).

## 6.6 Aktivierung von Proteinkinasen durch EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1

Die Auswirkungen der stabilen Expression von EGFP-Rac1b bzw. EGFP-Rac1 auf die Signaltransduktion in H23-Zellen wurden mithilfe von Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern in Western Blot-Analysen durchgeführt.



**Abbildung 22: Analyse der Aktivität von Proteinkinasen in stabil EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellklonen.**

Durch die Analyse der jeweiligen Phosphorylierungsstellen wurde der Einfluss von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 auf die Aktivität der MAPKs und der Proteinkinasen Akt und GSK3β untersucht. Dabei wurde durch EGFP-Rac1b sowohl eine Zunahme an phosphoryliertem p38, JNK2 und Akt nachgewiesen als auch eine Zunahme der entsprechenden Gesamtproteinmenge, was auf eine Zunahme der absoluten Mengen von aktiver p38, JNK2 und Akt verglichen mit der in EGFP-exprimierenden Kontrollzellen hindeutet. EGFP-Rac1b bewirkte zudem eine Zunahme der GSK3β-Phosphorylierung ohne die Gesamtproteinmenge zu beeinflussen. Mit Ausnahme von JNK2, bei der nur P-JNK2 aber nicht die Gesamtproteinmenge durch EGFP-Rac1 erhöht wurde, aktivierte EGFP-Rac1 die analysierten Kinasen vergleichbar zu EGFP-Rac1b. Die Färbung von GAPDH diente als Beladungskontrolle. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt.

Dabei wurde gezeigt, dass weder EGFP-Rac1b noch EGFP-Rac1 den Phosphorylierungsstatus und somit die Aktivität der MAPKs ERK1/2 beeinflusste (Abbildung 22).

Eine Analyse der MAPK p38 zeigte, dass in beiden stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Klonen eine stärkere Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Diese ging aber mit einer Zunahme der Gesamtproteinkonzentration von p38 einher. Somit bleibt der prozentuale Anteil der aktivierten MAPK p38 mit der in den EGFP-exprimierenden Kontrollzellen vergleichbar. Die absolute Menge an aktivierter p38 ist jedoch durch EGFP-Rac1b in diesen Zellen erhöht (Abbildung 22).

Eine Zunahme an phosphoryliertem p38 und die Zunahme der Gesamtproteinmenge konnte ebenfalls in den beiden stabil EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klonen beobachtet werden (Abbildung 22).

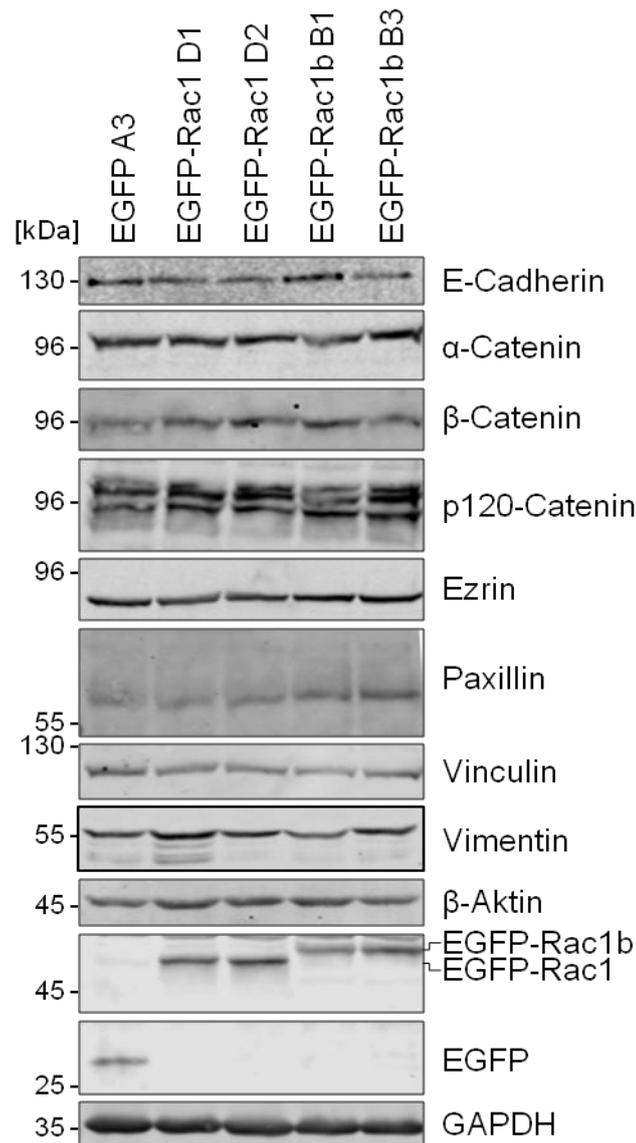
Für die dritte MAPK-Gruppe JNK1/2 waren die Ergebnisse der Antikörper-Färbungen sehr heterogen. In 4 von 7 Färbungen wurde weder durch EGFP-Rac1b noch durch EGFP-Rac1 eine Änderung der JNK1-Aktivität oder JNK1-Proteinmenge nachgewiesen.

Dagegen bewirkten beide Rho-GTPasen eine Aktivierung von JNK2, wobei diese durch EGFP-Rac1b stärker ausfiel als durch EGFP-Rac1 (Abbildung 22). Gleichzeitig kann in den stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen eine schwache Zunahme der JNK2-Gesamtproteinkonzentration nachgewiesen werden, sodass zwar nicht der prozentuale Anteil aber die absolute Menge an aktivem JNK2 in EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen größer ist als in den EGFP- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klonen (Abbildung 22).

Die Proteinkinasen Akt und GSK3 $\beta$  zeigten eine deutliche Zunahme der Phosphorylierungsspezifischen Färbung durch die stabile Expression von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 (Abbildung 22). Während die Gesamtproteinmenge von GSK3 $\beta$  von den Rho-GTPasen nicht beeinflusst wurde, so wurde eine leichte Zunahme der Akt-Proteinkonzentration durch beide EGFP-Rac-Proteine beobachtet. Es wurde daher kein prozentualer Anstieg, sondern eine absolute Zunahme an aktivem Akt in den EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klonen beobachtet (Abbildung 22).

## **6.7 EGFP-Rac1, aber nicht EGFP-Rac1b, bewirkt eine De-Differenzierung der H23-Zellen**

Um den langfristigen Effekt einer EGFP-Rac1b-Expression auf die H23-Zellen hinsichtlich des Differenzierungsstatus zu analysieren, wurden verschiedene epitheliale und mesenchymale Differenzierungsmarker in den H23-Zellklonen untersucht. Trotz insgesamt geringer E-Cadherin-Proteinmengen in H23-Zellen wurde im stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Klon B3 eine Reduktion des epithelialen Markerproteins nachgewiesen, während der andere EGFP-Rac1b-exprimierende Klon B1 keine Änderung der E-Cadherin-Proteinkonzentration aufwies (Abbildung 23). Durch EGFP-Rac1 wurde dagegen in beiden



**Abbildung 23: Analyse des Differenzierungsstatus der stabil EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellen.**

Im stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Klon B3 und in den beiden stabil EGFP-Rac1-exprimierenden Klonen wurden eine reduzierte E-Cadherin- und erhöhte Vimentin-Proteinmengen nachgewiesen. Die β-Catenin-Proteinmenge wurde durch beide EGFP-Rac-Isoformen erhöht. Die GAPDH-Färbung diente als Beladungskontrolle. Es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt.

Klonen eine Reduktion dieses epithelialen Markerproteins nachgewiesen (Abbildung 23). Durch die stabile Expression beider EGFP-Rac-Isoformen wurde β-Catenin als Teil des Cadherin-Adhäsionskomplexes hochreguliert, während α- und p120-Catenin nicht beeinflusst wurden (Abbildung 23).

Eine Analyse des mesenchymalen Markerproteins Vimentin ergab eine entgegengesetzte Regulation der Proteinmenge verglichen mit dem epithelialen Differenzierungsmarker E-Cadherin: Die Vimentin-Proteinmenge lag im stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Klon B3 und in den beiden EGFP-Rac1-exprimierenden Klonen D1 und D2 erhöht vor (Abbildung 23).

Die anderen analysierten Proteine Ezrin, Paxillin und Vinculin wurden durch keine der EGFP- Rac-Isoformen beeinflusst (Abbildung 23).

Die Rolle von Rac1 und Rac1b in der Regulation des Aktin-Zytoskelett sind in der Literatur sehr gut beschrieben. Daher wurde in diesem Experiment der Einfluss von EGFP-Rac1b auf die  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge in den H23-Zellklonen untersucht und mit dem Effekt von EGFP-Rac1 verglichen. Jedoch beeinflusste keine der beiden Rho-GTPasen die  $\beta$ -Aktin-Gesamtproteinmenge in diesen H23-Klonen (Abbildung 23).

## 6.8 EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 bewirken Veränderungen des Aktin-Zytoskelett

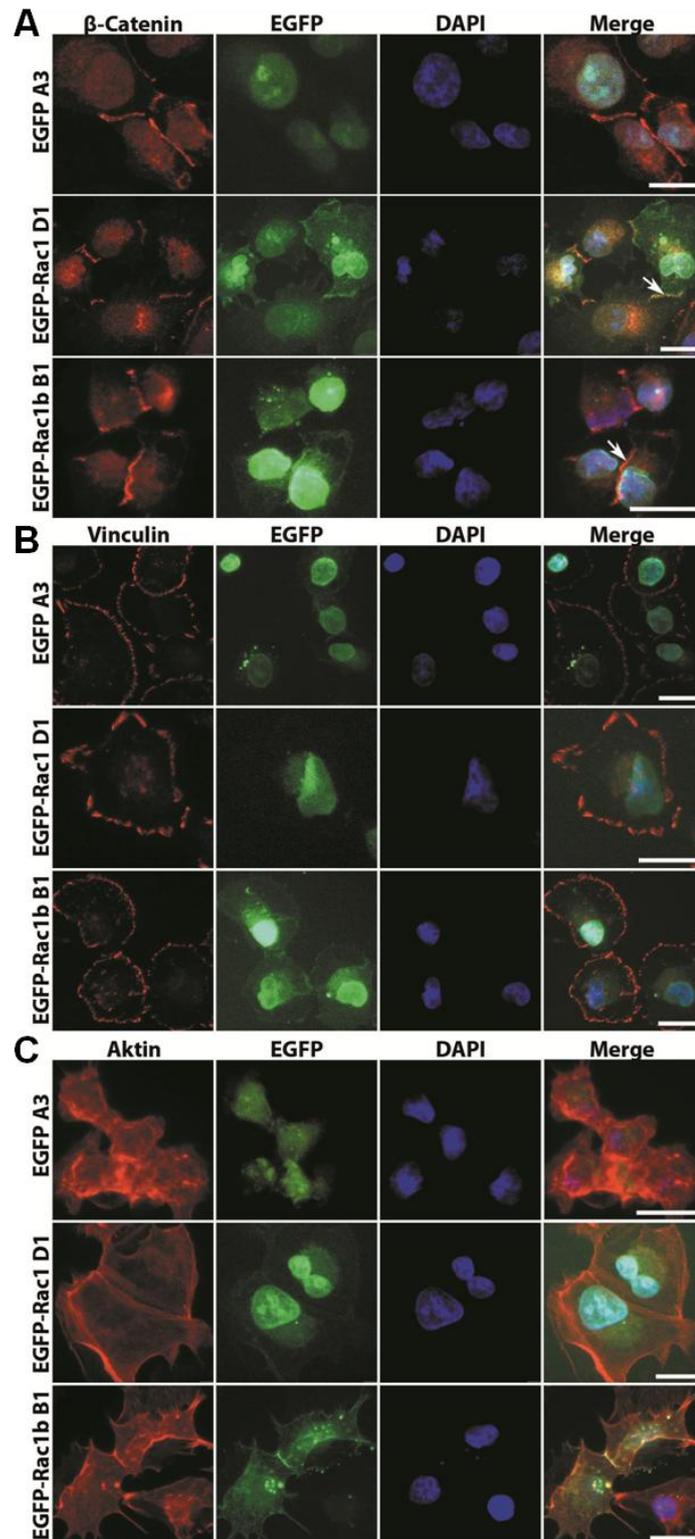
Die meisten in Abbildung 23 analysierten Proteine, die den Differenzierungsstatus der Zellen bestimmen sollten, zeigten keine EGFP-Rac-induzierte Änderung der Proteinkonzentration. Neben der Gesamtproteinmenge kann die Funktion von Proteinen durch die Lokalisation in der Zelle reguliert werden. Um den Effekt von EGFP-Rac1b auf die Proteinlokalisierung zu untersuchen und mit den Effekten von EGFP-Rac1 zu vergleichen, wurde mittels Immunfluoreszenz beispielhaft die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin, Vinculin und  $\beta$ -Aktin in den H23-Klonen analysiert.

Die  $\beta$ -Catenin-Färbung der stabil EGFP-exprimierenden Zellen zeigte einerseits eine zytosolische, perinukleäre Lokalisation und andererseits eine Membranfärbung, hauptsächlich in Bereichen von Zell/Zell-Kontakten (Abbildung 24A).

Diese Proteinverteilung wurde weder durch EGFP-Rac1b noch durch EGFP-Rac1 verändert. Interessanterweise wurde für EGFP-Rac1b, aber auch für EGFP-Rac1, eine Ko-Lokalisation der EGFP-Rac-Proteine mit  $\beta$ -Catenin an den Zell/Zell-Kontakten nachgewiesen (Pfeile, Abbildung 24A). Diese war im stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Klon B1 schwächer nachweisbar als im EGFP-Rac1-exprimierenden Klon D1. Dies kann möglicherweise auf die starke, nukleäre Fluoreszenz des EGFP-Tags zurückgeführt werden, die die Membran-Lokalisation von EGFP-Rac1b überstrahlt (Abbildung 24A).

Vinculin ist unter anderem an der Ausbildung von Zell/Matrix-Kontakten beteiligt, die in diesem Versuch die Zelle mit der darunterliegenden Glasoberfläche verbindet. Im EGFP-exprimierenden Kontrollklon wurde eine punktuelle Vinculin-Färbung an den Zellgrenzen nachgewiesen, die mögliche Zell/Matrix-Kontakte darstellen können (Abbildung 24B). Diese Vinculin-Lokalisation wurde durch die stabile Expression von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 nicht verändert (Abbildung 24B).

Bei der am besten charakterisierten Funktion der Rho-GTPasen handelt es sich um die Regulation des Aktin-Zytoskeletts. Um dessen Regulation in den EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klonen zu untersuchen, wurde das Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin-Texas Red angefärbt. Dabei war F-Aktin im EGFP-exprimierenden Zellklon A3 im



**Abbildung 24: Lokalisation von  $\beta$ -Catenin, Vinculin und Aktin in den stabil EGFP-Rac1- bzw. EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klonen.**

**[A]** Die  $\beta$ -Catenin-Färbung zeigte in allen drei analysierten H23-Zellklonen eine Lokalisation im Zytosol sowie an der Plasmamembran mit einer Konzentration im Bereich von Zell/Zell-Kontakten. Pfeile deuten auf Bereiche der Ko-Lokalisation von  $\beta$ -Catenin mit EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b. **[B]** Die Vinculin-Färbung zeigte eine Lokalisation an den Zellrändern, die nicht durch EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b reguliert wurde. **[C]** Die Aktin-Färbung im EGFP A3-Klon wies eine zytosolische Aktin-Verteilung ohne eindeutige Strukturen auf. Die Expression von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 bewirkte die Ausbildung eines subkortikalen Aktinringes sowie dünner Zellfortsätze. **[A-C]** Die Färbungen wurden in drei unabhängigen Experimenten analysiert und beispielhafte Bilder dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu$ m.

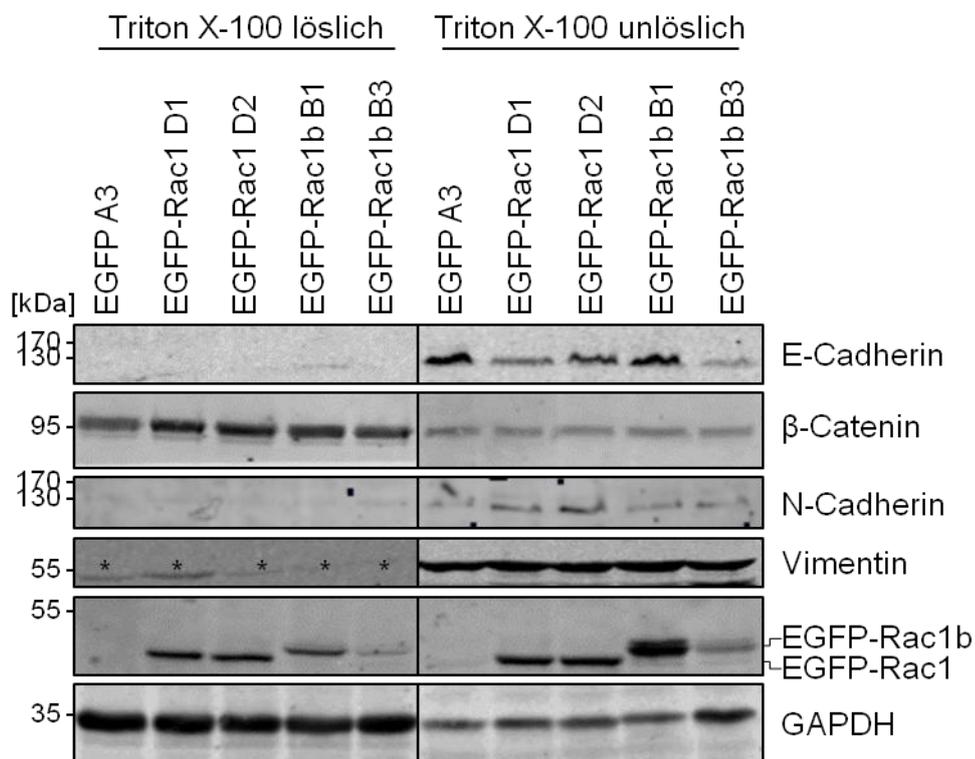
Zytosol lokalisiert, ohne eindeutige Strukturen auszubilden (Abbildung 24C).

Durch die stabile Expression von EGFP-Rac1b wurde die Ausbildung eines subkortikalen Aktinringes sowie langer, dünner zellulärer Fortsätze induziert (Abbildung 24C).

Die Ausbildung des subkortikalen Aktinringes sowie zellulärer Fortsätze wurde auch durch die stabile Expression von EGFP-Rac1 beobachtet. Die zellulären Fortsätze waren jedoch kürzer und breiter als im EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klon (Abbildung 24C).

## 6.9 EGFP-Rac1, aber nicht EGFP-Rac1b, bewirkte eine Verschiebung von E- zu N-Cadherin-vermittelten Zell/Zell-Kontakten

Wie in Abbildung 24C gezeigt, regulieren EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 das Aktin-Zytoskelett in den H23-Zellen. Diese Veränderungen wurden im Folgenden weiter analysiert, indem das Aktin-Zytoskelett sowie damit assoziierte Proteine mithilfe der Triton X-100-Fraktionierung angereichert wurden. Dabei entstehen zwei Fraktionen: die Triton X-100 unlösliche Fraktion, in der unter anderem Aktinfilamente und die damit assoziierten Proteine angereichert sind und die Triton X-100 lösliche Fraktion, die nur geringe Mengen an filamentösem Aktin und an Aktin-Zytoskelett-assoziierten Proteinen enthält.



**Abbildung 25: EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-induzierte Effekte auf die Proteinverteilung in Triton X-100 löslichen und unlöslichen Fraktionen.**

Durch die Triton X-100-Fraktionierung wurden Triton X-100 lösliche von Triton X-100 unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Dabei wurden in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion erhöhte N-Cadherin- und leicht reduzierte E-Cadherin-Level in den EGFP-Rac1-exprimierenden Zellklonen nachgewiesen. In der Triton X-100 löslichen Fraktion wurde für alle H23-Zellklone  $\beta$ -Catenin und EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b nachgewiesen. \* unspezifische Bande. Die GAPDH-Färbung diente als Beladungskontrolle. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt.

In der Triton X-100 löslichen Fraktion wurde weder der epitheliale Differenzierungsmarker E-Cadherin noch die mesenchymalen Markerproteine N-Cadherin und Vimentin nachgewiesen (Abbildung 25).

In dieser Fraktion war von den analysierten Proteinen lediglich  $\beta$ -Catenin nachweisbar, das, verglichen mit den EGFP-exprimierenden H23-Zellen, in stabil EGFP-Rac1b-, aber auch in stabil EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellen erhöht vorlag (Abbildung 25).

In der Triton X-100 unlöslichen Fraktion wurden E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin, N-Cadherin und Vimentin nachgewiesen.

Hierbei zeigten die beiden stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Klone heterogene Effekte auf die E-Cadherin-Proteinmenge. Der B1-Klon wies vergleichbare E-Cadherin-Mengen auf wie die stabil EGFP-exprimierenden Kontrollzellen, während die E-Cadherin-Konzentration im B3-Klon deutlich reduziert vorlag (Abbildung 25). Diese Heterogenität der beiden EGFP-Rac1b-exprimierenden Klone wurde zuvor schon in Abbildung 23 für die E-Cadherin-Gesamtproteinmenge beobachtet.

Die  $\beta$ -Catenin-, N-Cadherin- und Vimentin-Proteinmengen wurden durch EGFP-Rac1b nicht beeinflusst (Abbildung 25).

In den beiden stabil EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klonen lagen reduzierte Mengen an Aktin-assoziiertem E-Cadherin vor, wobei im D1-Klon weniger E-Cadherin nachgewiesen wurde als im D2-Klon (Abbildung 25).

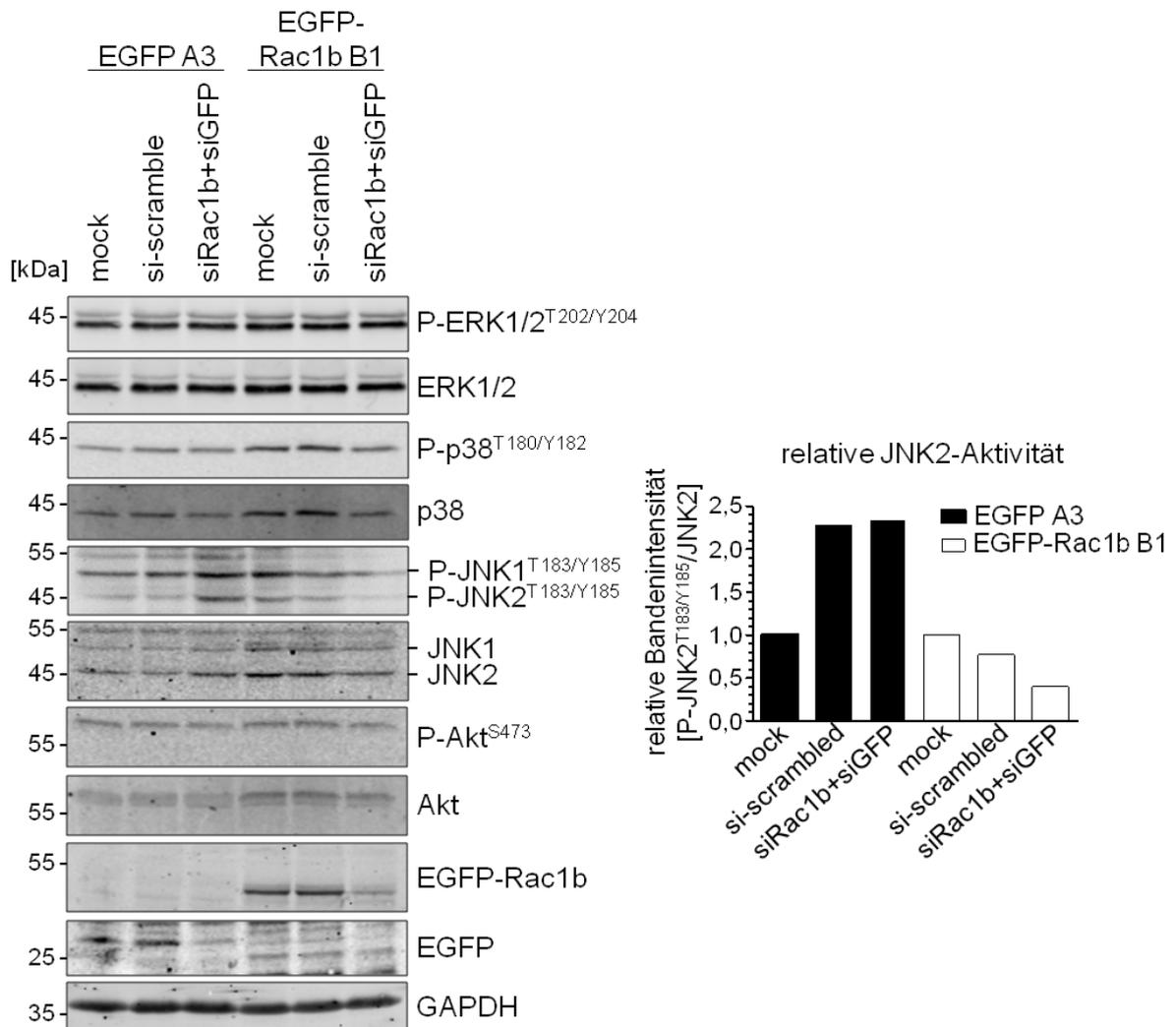
Dies ging mit einer Zunahme der Aktin-assoziierten N-Cadherin-Proteinmenge in beiden EGFP-Rac1-exprimierenden Zellklonen einher (Abbildung 25). Es wurde somit in EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellen eine Verschiebung in den Cadherin-vermittelten Zell/Zell-Kontakten beobachtet.

Die  $\beta$ -Catenin- und Vimentin-Proteinmenge wurde durch EGFP-Rac1 nicht beeinflusst (Abbildung 25).

## 6.10 Rac1b-Knockdown in EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen

Durch die dauerhaft erhöhte Rac1b-Konzentration in den stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klonen können möglicherweise Anpassungsmechanismen in diesen Zellen aktiviert werden, die den kurzzeitigen Rac1b-Effekten entgegenwirken, um die Funktionalität der Zellen aufrecht zu erhalten. Um die Existenz solcher Adaptationen nachzuweisen und von den spezifischen, Rac1b-induzierten Effekten zu unterscheiden, wurden in ausgewählten Klonen (EGFP A3 und EGFP-Rac1b B1) siRNA-vermittelte Knockdown-Experimente durchgeführt, wobei der EGFP-Rac1b-exprimierende Klon B1 aufgrund seiner konstant hohen EGFP-Rac1b-Expression ausgewählt wurde. Dabei wurde für den spezifischen Rac1b/EGFP-Rac1b-Knockdown eine Mischung aus zwei siRNA-Sequenzen

(siRac1b+siGFP) verwendet, die einerseits die Rac1b- und andererseits die EGFP-Sequenz erkannten.



**Abbildung 26: Effekte des Rac1b/EGFP-Rac1b-Knockdowns im EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellklon B1.**

Der Knockdown von Rac1b/EGFP-Rac1b mittels siRNA (siRac1b+siGFP) für 72 h führte in dem analysierten, stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellklon zu einer Reduktion der p38- und JNK1/2-Phosphorylierung und -Gesamtproteinmenge. Rechts ist eine Quantifizierung der relativen JNK2-Aktivität dargestellt, die eine Abnahme der JNK2-Aktivität durch den Knockdown von Rac1b/EGFP-Rac1b in den stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen in diesem Blot nachweist. Dabei wurden die jeweiligen mock-Kontrollen auf „1“ normiert. Die GAPDH-Färbung diente als Beladungskontrolle. Es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt.

Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 72 h nach der siRNA-Transfektion inkubiert. Eine Quantifizierung der EGFP-Rac1b- und EGFP-Bandenintensität zeigte, dass die mittlere Knockdown-Effizienz aus drei unabhängigen Versuchen in den EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen 62,0 +/- 10,8 % und in den EGFP-exprimierenden Zellen 45,0 +/- 26,7 % betrug (Abbildung 26).

Die ERK1/2-Aktivität, die durch Phosphorylierungs-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnte, wurde durch den Knockdown von Rac1b/EGFP-Rac1b in diesen H23-

Zellklonen nicht beeinflusst (Abbildung 26).

Der Knockdown von Rac1b/EGFP-Rac1b führte zu einer Reduktion der p38-Phosphorylierung und p38-Gesamtproteinmenge im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-behandelten EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen (Abbildung 26).

Durch den Knockdown von Rac1b/EGFP-Rac1b im EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellklon B1 nahmen die Phosphorylierung und die Gesamtproteinmenge beider JNK-Isoformen verglichen mit der *si-scrambled*-Kontrolle ab. Eine Quantifizierung der Bandenintensität zeigte dabei, dass die relative JNK2-Aktivität trotz Abnahme der JNK2-Proteinmenge durch den Rac1b/EGFP-Rac1b-Knockdown reduziert wurde (Abbildung 26).

Im EGFP-exprimierenden Klon A3 wurde eine verstärkte JNK2-Phosphorylierung durch den Rac1b/EGFP-Rac1b-Knockdown detektiert. Die Gesamtproteinmenge von JNK1/2 wurde durch den siRNA-vermittelten Rac1b/EGFP-Rac1b-Knockdown nicht beeinflusst. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten zeigte, dass bereits die Transfektion des EGFP A3-Klons mit einer Kontroll-siRNA zu einer Zunahme der relativen JNK2-Aktivität in den Zellen führt (Abbildung 26).

Die Phosphorylierung und die Gesamtproteinmenge der Proteinkinase Akt wurde durch den Rac1b/EGFP-Rac1b-Knockdown nicht beeinflusst. Auch die Kontrollexperimente zeigten keine Änderung der Akt-Phosphorylierung (Abbildung 26).

### **6.11 Die 3D-Kultivierung stabil EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-exprimierender H23-Zellen**

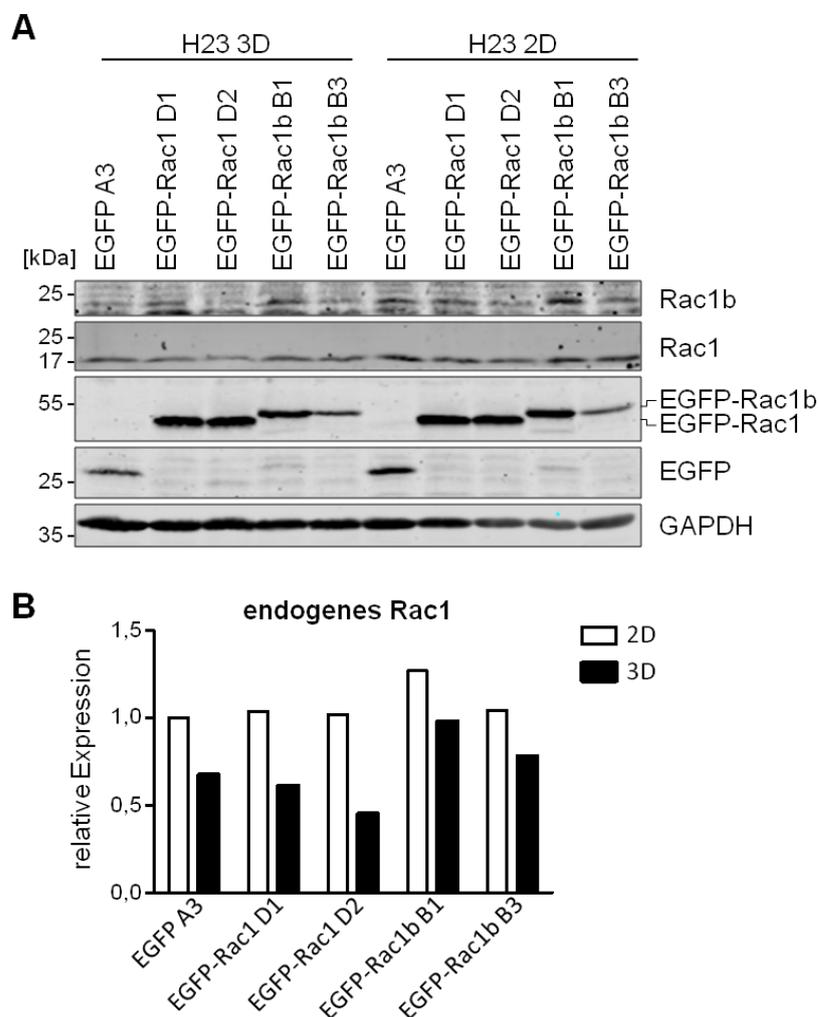
Die bisherigen Versuche wurden mit Zellen durchgeführt, die 2-dimensional (2D) als Monolayer auf einer Plastikoberfläche kultiviert wurden. Diese Kultivierungsart spiegelt nicht die *in vivo*-Bedingungen eines humanen Tumors wider, bei der Zellen an allen Seiten mit benachbarten Zellen in Kontakt treten können bzw. auf einer Basalmembran wachsen und mit anderen Zelltypen direkt oder indirekt interagieren können. Um diese Wachstumsmöglichkeiten nachzustellen, wurden die stabil EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellklone mithilfe eines 3-dimensionalen (3D) Modells kultiviert und der Differenzierungsstatus überprüft. Dabei wurde von der magnetischen Levitation Gebrauch gemacht, bei der Eisenoxid-Nanopartikel von den Zellen aufgenommen werden (siehe 3.4.2.4). Durch das Anlegen eines magnetischen Feldes bildet sich innerhalb von 24 h ein im Medium schwebendes, kugelförmiges Sphäroid. Nach einer Kultivierung von weiteren 48 h erreicht das Sphäroid einen Durchmesser von etwa 1 mm (Daten nicht gezeigt).

In ersten Versuchen wurde die Proteinkonzentration von endogenem Rac1b bzw. Rac1 nach einer 3D-Kultivierung für 72 h untersucht. Endogenes Rac1b war in den stabil EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellen nur schwach nachweisbar und zwischen den Zellklonen sehr heterogen exprimiert. Diese Unterschiede konnten aber weder auf die Kultivierungsart noch

auf die stabile Expression eines der beiden EGFP-Rac-Proteine zurückgeführt werden (Abbildung 27A).

Endogenes Rac1 konnte in allen Zellklonen deutlich nachgewiesen werden. Verglichen mit den 2D-kultivierten, stabil EGFP-exprimierenden H23-Zellen führte die 3D-Kultivierung der stabil EGFP- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klone zu einer Reduktion der endogenen Rac1-Proteinmenge (EGFP A3: 0,67; EGFP-Rac1 D1: 0,61; EGFP-Rac1 D2: 0,45) (Abbildung 27A, B).

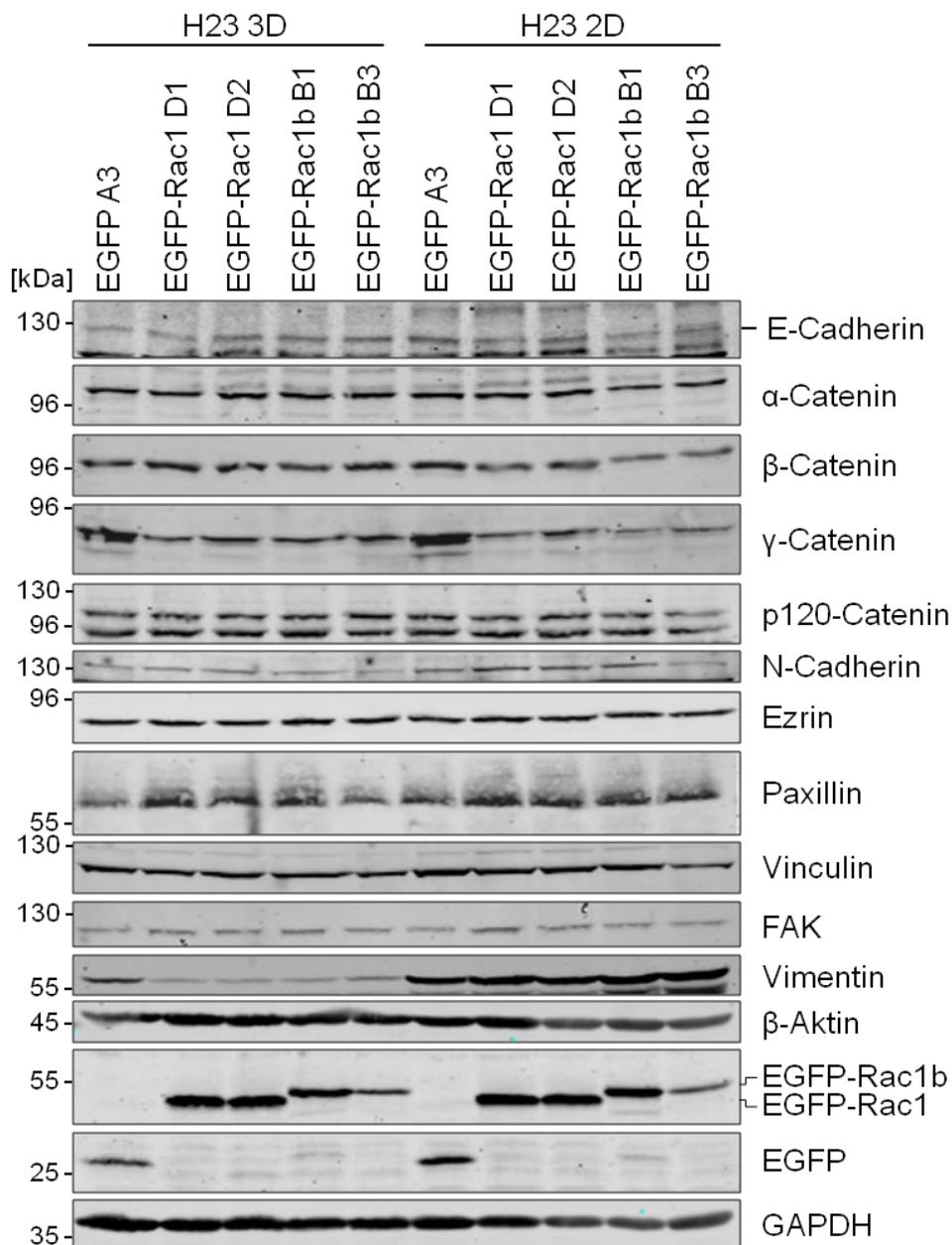
Die endogenen Rac1-Mengen der stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen blieben dagegen vergleichbar mit denen der 2D-kultivierten Kontrollzellen (EGFP-Rac1b B1: 0,98; EGFP-Rac1b B3: 0,78) (Abbildung 27A, B).



**Abbildung 27 Einfluss der 3D-Kultivierung auf die Expression von endogenem Rac1b und Rac1 in stabil EGFP-Rac-exprimierenden H23-Zellen.**

**[A]** Endogenes Rac1b wurde zwischen den Klonen sehr heterogen nachgewiesen und zeigte weder eine Korrelation mit stabil exprimiertem EGFP-Rac1b bzw. EGFP-Rac1 noch mit der Kultivierung in 2D oder 3D. Die 3D-Kultivierung der EGFP- und EGFP-Rac-exprimierenden H23-Zellen reduzierte die endogene Rac1-Proteinmenge verglichen mit den entsprechenden 2D-kultivierten Zellen. Die GAPDH-Färbung diente als Beladungskontrolle. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt. **[B]** Die Rac1-Bandenintensität wurde densitometrisch quantifiziert und auf den 2D-kultivierten EGFP-exprimierenden Klon A3 normiert. Dabei wurde nur der Blot aus **[A]** verwendet.

Im Anschluss wurden die Proteine des E-Cadherin-vermittelten Adhäsionskomplexes E-Cadherin,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, p120-Catenin und Vinculin im Gesamtlysat untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch die stabile Expression von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 die Proteinmengen von  $\gamma$ -Catenin deutlich reduzierte, was sowohl in der 2D- als auch in der 3D-Kultivierung nachgewiesen wurde. Die anderen Proteine des E-Cadherin-Adhäsionskomplexes sind in ihrer Menge weder in den 3D-kultivierten, magnetischen Sphäroiden



**Abbildung 28: Einfluss der 3D-Kultivierung auf den Differenzierungsstatus der stabil EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klone.**

H23-Zellen, die stabil EGFP, EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b exprimierten, wurden durch magnetische Levitation für 72 h in 3D kultiviert und auf verschiedene Proteine analysiert. Dabei sind insbesondere die mesenchymalen Proteine N-Cadherin und Vimentin durch die 3D-Kultivierung reduziert. Die Expression von EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b bewirkte in der 3D-Kultivierung eine zusätzliche Reduktion der Vimentin-Proteinmenge. Die GAPDH-Färbung diente als Beladungskontrolle. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt.

verglichen mit den 2D-kultivierten Zellen verändert, noch durch die EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-Expression im Vergleich zu den EGFP-Kontrollzellen (Abbildung 28).

Eine Analyse der mesenchymalen Differenzierungsmarker N-Cadherin und Vimentin zeigte eine Reduktion der Proteinmengen durch die 3D- im Vergleich zur 2D-Kultivierung. Dabei wurde eine additive Repression von Vimentin durch die 3D-Kultivierung und der Expression von EGFP-Rac1b bzw. EGFP-Rac1 beobachtet.

Durch die 3D-Kultivierung der EGFP-Rac-exprimierenden H23-Zellen wurde durch beide EGFP-Rac-Isoformen erhöhte Paxillin-Proteinmengen nachgewiesen, die unter 2D-Kultivierungsbedingungen nicht gezeigt wurde.

Die anderen, an Integrin-basierten Zell/Matrix-Kontakten beteiligten Proteine (Ezrin, Vinculin, FAK) sowie  $\beta$ -Aktin wurden durch die 3D-Kultivierung nicht reguliert (Abbildung 28).

Mit diesem Versuch wurde gezeigt, dass die Zunahme der Paxillin-Proteinmenge und die Reduktion des mesenchymalen Markerproteins Vimentin auf einem additiven Effekt der 3D-Kultivierung und der EGFP-Rac-Expression beruhen. Die anderen analysierten Proteine zeigten durch die magnetische 3D-Kultivierung keine veränderten Proteinmengen in den stabil EGFP-Rac-exprimierenden H23-Zellen.

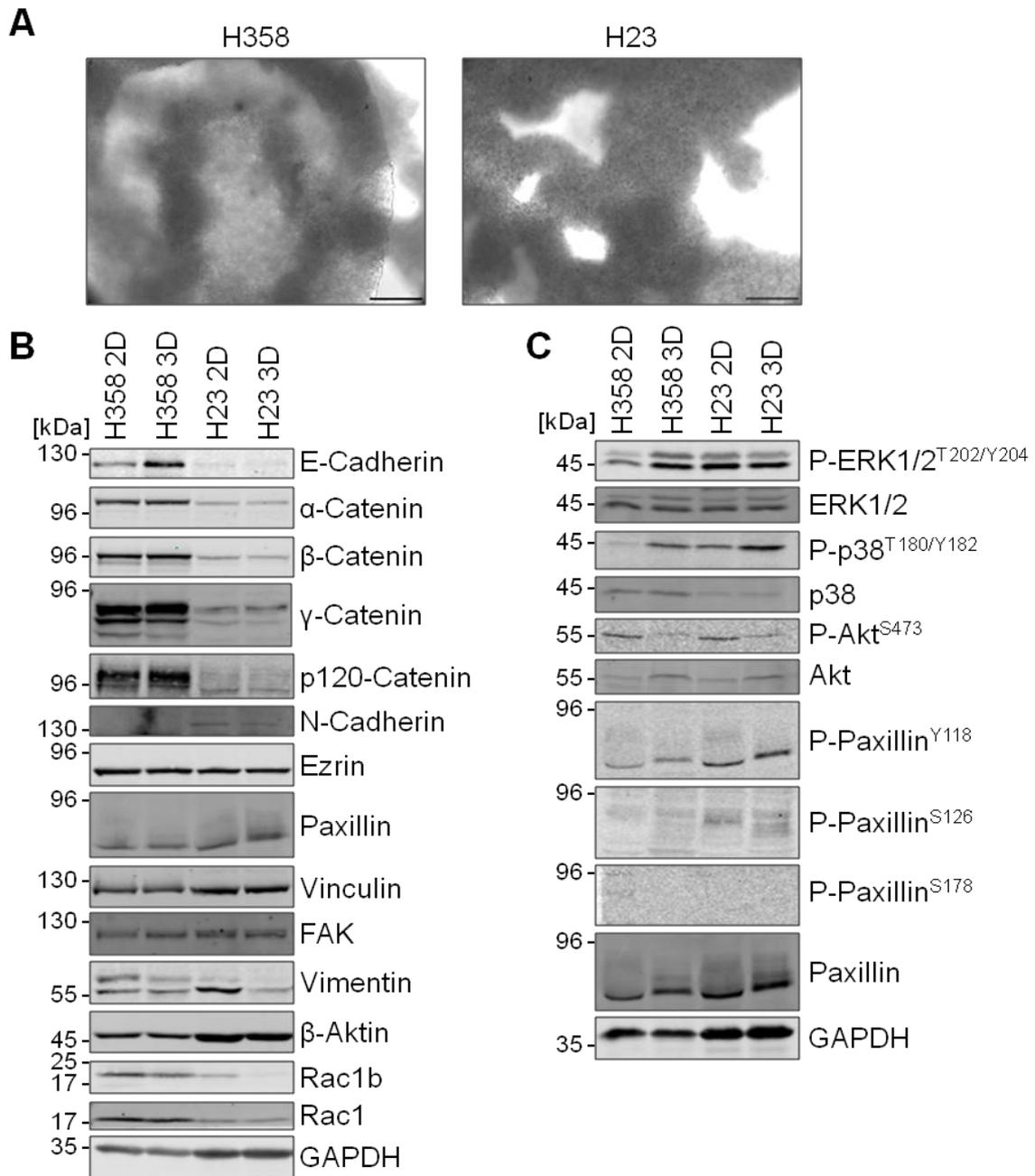
## 6.12 Vergleich der verschiedenen 3D-Kultivierungsmodelle

Um die Effekte der 3D-Kultivierung näher zu untersuchen, wurden die beiden NSCLC-Zelllinien H358 und H23 mithilfe verschiedener 3D-Kultivierungsmethoden kultiviert und anschließend deren phänotypische, proteinbiochemischen und molekularbiologischen Eigenschaften analysiert.

### 6.12.1 Die magnetische Levitation

Im ersten Schritt wurden die beiden NSCLC-Zelllinien mithilfe der magnetischen Levitation in 3D kultiviert. Schon 24 h nach Anlegen des magnetischen Feldes bildeten beide Zelllinien 3D-Strukturen aus, die sich deutlich voneinander unterschieden: Die eher differenziert-wachsende Zelllinie H358 bildete ein kompaktes, kugelförmiges Sphäroid aus, während die undifferenzierter-wachsende Zelllinie H23 eine eher lockere, schwammartige Kugel formte (Abbildung 29A). Diese strukturellen Unterschiede waren über die gesamte Kultivierungsdauer von 72 h zu beobachten. Die magnetischen Sphäroide nahmen in beiden Zelllinien einen Durchmesser von ca. 1 mm an (Abbildung 29A).

Nach 72 h wurden die durch magnetische Levitation generierten, magnetischen Sphäroide lysiert und der Differenzierungsstatus überprüft. Dabei fiel auf, dass bei beiden Zelllinien viele der analysierten Proteine ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, p120-Catenin, Ezrin, Paxillin, Vinculin, FAK,  $\beta$ -Aktin und Rac1) keine deutlichen Mengenunterschiede zwischen der 2D- und 3D-Kultivierung aufwiesen (Abbildung 29B).



**Abbildung 29: Effekte der magnetischen Levitation auf H358- und H23-Zellen.**

**[A]** H358- und H23-Zellen wurden mithilfe der magnetischen Levitation in 3D kultiviert. Nach 72 h bildeten die H358-Zellen ein kompaktes, kugelförmiges Sphäroid und die H23-Zellen eine lockere, schwammartige Kugel aus. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100  $\mu\text{m}$ . **[B]** Die Proteinkonzentration von Komponenten des Zell/Zell- und Zell/Matrix-Adhäsionskomplexes wurde in 3D-kultivierten H358- und H23-Zellen untersucht. Dabei wurden in den H358-Zellen eine Hochregulation von E-Cadherin und eine Herunterregulation von Rac1b nachgewiesen. In den H23-Zellen bewirkte die 3D-Kultivierung eine Abnahme von N-Cadherin, Vimentin und Rac1b. **[C]** Die 3D-Kultivierung bewirkte in den H358- und H23-Zellen eine erhöhte Phosphorylierung der MAPK p38 und eine reduzierte Phosphorylierung der Proteinkinase Akt. In den 3D-kultivierten H358-Zellen wurde zusätzlich eine erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet. **[B, C]** Die GAPDH-Färbung diente als Beladungskontrolle. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt.

In H358-Zellen wurde der epitheliale Marker E-Cadherin durch die 3D-Kultivierung deutlich hoch- und die Rho-GTPase Rac1b herunterreguliert. Die mesenchymalen Differenzierungsmarker N-Cadherin und Vimentin blieben durch die 3D-Kultivierung

unverändert (Abbildung 29A).

In den H23-Zellen bewirkte die 3D-Kultivierung eine deutliche Abnahme der mesenchymalen Markerproteine N-Cadherin und Vimentin, sowie eine Reduktion der endogenen Rac1b-Proteinmengen. Die ohnehin geringen E-Cadherin-Mengen zeigten im Western Blot keine signifikante Veränderung durch die 3D-Kultivierung (Abbildung 29B).

Nachdem deutliche Effekte auf den Differenzierungsstatus der beiden Zelllinien durch die magnetische 3D-Kultivierung beobachtet wurden, wurden Signalwege untersucht, die einen Einfluss auf die Differenzierung von Zellen ausüben können. Dabei wurde die Aktivität der MAPKs und Akt in 3D-kultivierten Zellen analysiert.

In den H358-Zellen bewirkte die 3D-Kultivierung eine erhöhte Phosphorylierung und somit Aktivierung von ERK1 und ERK2. In H23-Zellen wurde die ERK1/2-Aktivität jedoch durch die magnetische 3D-Kultivierung nicht weiter gesteigert (Abbildung 29C).

Die Aktivität der MAPK p38 nahm durch die 3D-Kultivierung in beiden Zelllinien deutlich zu, während die Proteinkinase Akt durch die magnetische 3D-Kultivierung in H358- und H23-Zellen inhibiert wurde (Abbildung 29C).

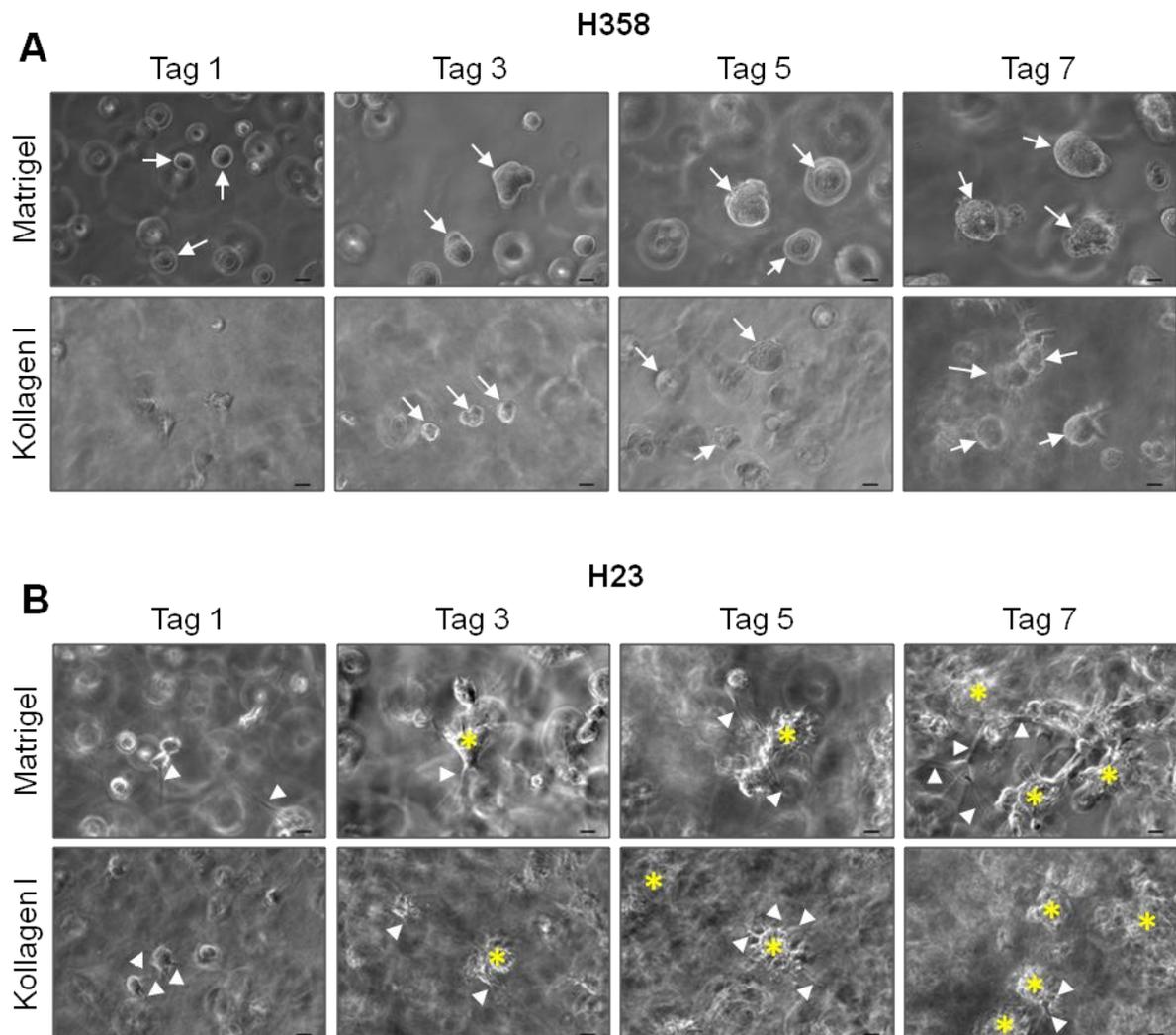
Um die Auswirkungen der 3D-Kultivierung auf die Funktion von Paxillin in den Integrin-abhängigen Zell/Matrix-Kontakten näher zu untersuchen, wurden diverse Phosphorylierungsstellen untersucht, die durch verschiedene Kinasen modifiziert und mit unterschiedlichen Funktionen in Verbindung gebracht werden. In den H358- und H23-Zellen bewirkte die 3D-Kultivierung keine Änderung der Paxillin-Gesamtproteinmenge (Abbildung 29C). Außerdem wurde keine Veränderung der Y118- und S126-phosphoryliertem Paxillin-Menge nachgewiesen. Eine Phosphorylierung an Position S178 wurde in keiner Zelllinie und unter keiner Kultivierungsbedingung detektiert (Abbildung 29C).

### 6.12.2 3D-Kultivierung in einer Hydrogelmatrix

Die magnetische Levitation ist eine einfache und effiziente Methode mit der die Auswirkungen der 3D-Kultivierung auf das Verhalten der Zellen untersucht werden kann. Humane Tumore sind allerdings durch einen großen EZM-Anteil gekennzeichnet, dessen Einfluss durch die magnetische Levitation allein nicht nachgestellt werden kann. Aus diesem Grund wurden die beiden NSCLC-Zelllinien H358 und H23 in verschiedenen Hydrogelmatrixen eingebettet, um neben dem Einfluss von Zell/Zell- auch die der Zell/Matrix-Kontakte analysieren zu können. Dabei wurden die Zellen entweder in eine 3D-Matrix aus Matrigel (isoliert aus dem EHS Maus-Sarkom) oder aus Kollagen I (1,5 mg/ml) eingebettet und über 7-10 Tage kultiviert.

Schon einen Tag nach Aussaat der Zellen als Einzelzellsuspension bildeten die H358-Zellen in einer 3D-Matrigelmatrix kompakte, kugelförmige Sphäroide aus (Pfeile, Abbildung 30).

Innerhalb der Kultivierungsdauer nahm der Durchmesser der Sphäroide kontinuierlich zu, bis ein Durchmesser von etwa 50  $\mu\text{m}$  erreicht wurde.



**Abbildung 30: 3D-Kultivierung von H358- und H23-Zellen in einer Matrigel- bzw. Kollagen I-Matrix.**

**[A]** H358- und **[B]** H23-Zellen wurden als Einzelzellsuspension in einer Matrigel- bzw. Kollagen I-Matrix eingebettet und über 7-10 Tage kultiviert. Nach spätestens 3 Tagen in einer Hydrogelmatrix bildeten beide Zelllinien spezifische, 3-dimensionale Strukturen aus. H358-Zellen lagerten sich zu einem kompakten, kugeligem Sphäroid (Pfeile) zusammen und die H23-Zellen bildeten ein verzweigtes, wabenartiges Netzwerk (\*: Zellaggregate, Pfeilkopf: zelluläre Ausläufer). Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .

Die Kultivierung der H358-Zellen in einer 3D-Kollagen I-Matrix bewirkte ebenfalls die Ausbildung von kompakten Sphäroiden. Diese 3D-Struktur wurde erst 3 Tage nach der Aussaat als Einzelzellsuspension beobachtet und bildete sich demnach deutlich später als in einer 3D-Matrigelmatrix. Als Folge davon wurde am korrespondierenden Kultivierungstag stets ein kleinerer Durchmesser für die Sphäroide beobachtet (Abbildung 30A).

Im Gegensatz zu den H358-Zellen bildeten die H23-Zellen keine kompakten Sphäroide, sondern vielmehr ein verzweigtes, wabenartiges Netzwerk, das sich durch die gesamte Matrix zieht. Dabei sind in den Matrigel-kultivierten Zellen schon sehr früh zelluläre Ausläufer

(Pfeilköpfe, Abbildung 30B) sichtbar, die sich in alle Richtungen ausstrecken. Auf diese Weise bildeten sich schließlich Zellaggregate (\*, Abbildung 30B), die miteinander verbunden sind. Dieser Phänotyp wurde ebenfalls durch die 3D-Kultivierung in einer Kollagen I-Matrix nachgewiesen, obwohl die Zellaggregate in dieser Matrix mehr Zellfortsätze ausbildeten. Für diese Zelllinie wurde keine verzögerte Ausbildung der 3D-Strukturen in einer Kollagen I-Matrix nachgewiesen (Abbildung 30B).

### **6.13 Die 3D-Matrigel-Kultivierung bewirkt eine epitheliale Differenzierung der H358- und H23-Zellen**

Die Ausbildung der kompakten und klar abgegrenzten Strukturen der H358-Zellen weist auf einen hohen Differenzierungsgrad der Zellen innerhalb der Hydrogelmatrix hin, während die Matrix-durchwachsende Eigenschaft der H23-Zellen auf einen geringeren Differenzierungsgrad hindeutet. Deshalb wurden die 3D-kultivierten Zellen nach 7-10 Tagen aus der jeweiligen Matrix herausgelöst und proteinbiochemisch analysiert.

Die 3D-Kultivierung der H358-Zellen in einer Matrigelmatrix veränderte nicht die Gesamtproteinmengen der epithelialen Differenzierungsmarker E-Cadherin und  $\alpha$ -Catenin oder eines der am Cadherin-Adhäsionskomplex-beteiligten Proteine  $\beta$ -,  $\gamma$ -, p120-Catenin oder Vinculin (Abbildung 31A).

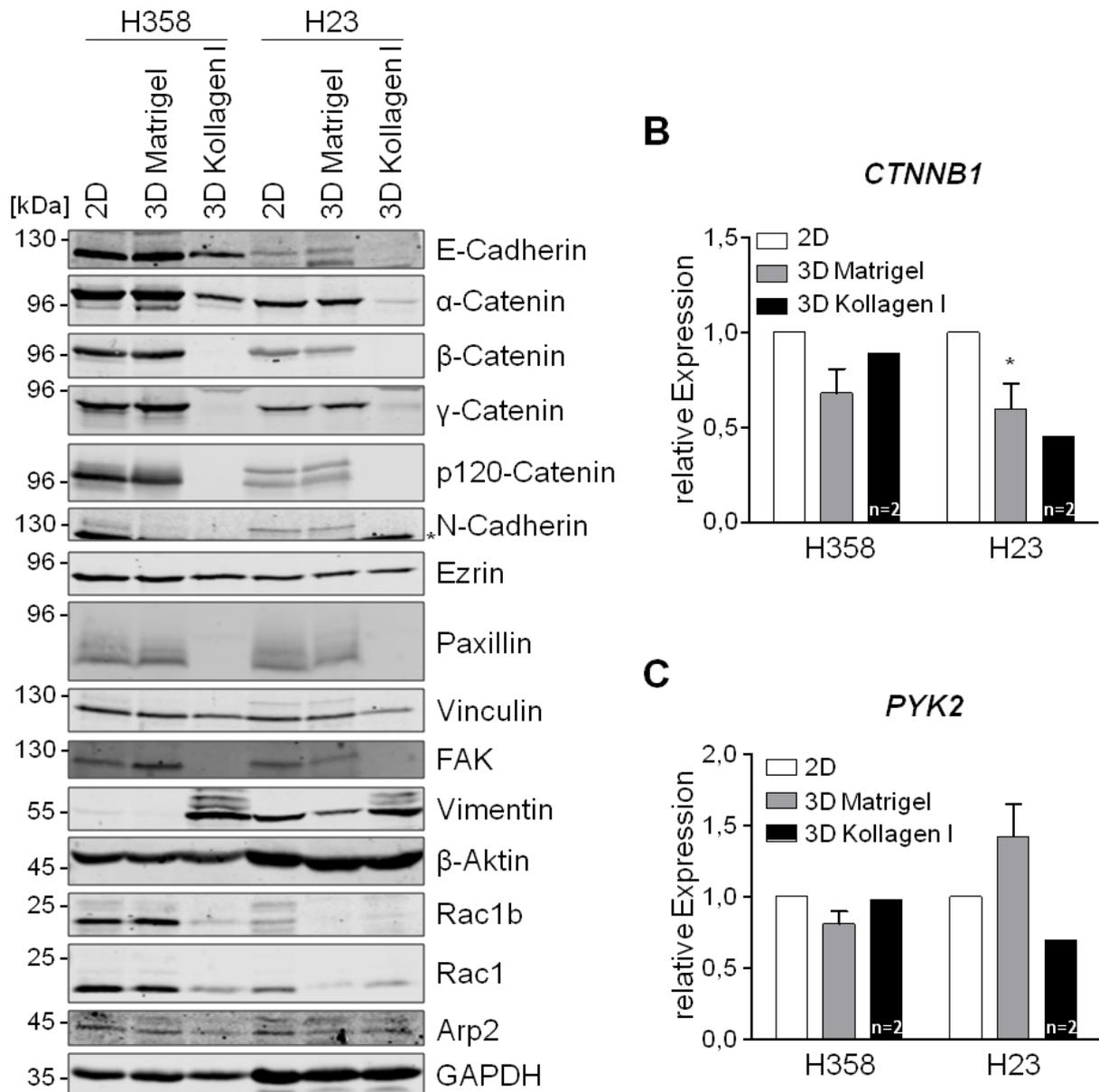
Die mesenchymalen Differenzierungsmarker N-Cadherin und Vimentin wiesen dagegen durch die 3D-Matrigel-Kultivierung reduzierte Proteinmengen auf (Abbildung 31A). Für Vimentin wurde diese Reduktion bereits in der magnetischen Levitation nachgewiesen (Abbildung 29B).

Außerdem wurde eine Zunahme der fokalen Adhäsionskinase (FAK) durch die Kultivierung in einer Matrigelmatrix beobachtet, die an der Ausbildung von Integrin-abhängigen Zell/Matrix-Kontakten beteiligt ist (Abbildung 31A).

H23-Zellen bilden in der Matrigelmatrix 3D-Strukturen aus, die die komplette Matrix durchziehen (Abbildung 30B). Dabei waren die ausgebildeten Zellaggregate deutlich von der Umgebung abgegrenzt. Eine Analyse der Differenzierungsmarker dieser Zellen zeigte eine leichte Zunahme der E-Cadherin-Konzentration, sowie eine Reduktion von  $\beta$ -Catenin, Vimentin und FAK. Dies deutet wie schon in den H358-Zellen auf eine epitheliale Differenzierung der Zellen durch die 3D-Kultivierung in einer Matrigelmatrix hin (Abbildung 31B). Des Weiteren wurde für die Matrigel-kultivierten H23-Zellen eine Reduktion der Rac1- und Rac1b-Proteinmengen nachgewiesen (Abbildung 31B).

Überraschenderweise war durch die Kollagen I-Kultivierung ein Nachweis vieler Proteine ( $\beta$ -,  $\gamma$ -, p120-Catenin, N-Cadherin, Paxillin, FAK) nicht mehr möglich und weitere Proteine wurden deutlich reduziert nachgewiesen (E-Cadherin,  $\alpha$ -Catenin, Vinculin, Rac1b, Rac1,

Arp2). Interessanterweise waren Ezrin und die Haushaltsproteine GAPDH und  $\beta$ -Aktin in unveränderter Menge nachweisbar. Beiden Zelllinien wiesen eine stärkere Vimentin-Bande durch die 3D-Kultivierung in einer Kollagen I-Matrix auf (Abbildung 31A).



**Abbildung 31: Effekte der 3D-Kultivierung in einer Hydrogelmatrix auf den Differenzierungsstatus.**

**[A]** H358- und H23-Zellen, die in einer Matrigel- bzw. Kollagen I-Matrix kultiviert wurden, wurden auf verschiedene Proteine analysiert, die den Differenzierungsstatus der Zellen definieren. Dabei wurden in H358-Zellen durch die Matrigel-Kultivierung N-Cadherin und Vimentin herunter- und FAK hochreguliert. In H23-Zellen bewirkte die Matrigel-Kultivierung eine leichte Zunahme von E-Cadherin und eine Abnahme von FAK, Vimentin, Rac1b und Rac1. Durch die Kollagen I-Kultivierung sind in beiden Zelllinien viele Proteine nicht nachweisbar oder stark reduziert, wobei Vimentin durch die Kollagen I-Kultivierung in beiden Zelllinien hochreguliert wurde. Die GAPDH-Färbung diente als Beladungskontrolle. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot abgebildet. **[B, C]** Für **[B]** *CTNNB1* (kodiert für  $\beta$ -Catenin) und **[C]** *PYK2* wurden qRT-PCRs durchgeführt um Änderungen in der mRNA-Menge durch die 3D-Kultivierung zu analysieren. Dabei wurde für die H23-Zellen eine signifikante Reduktion der *CTNNB1*-mRNA durch die 3D-Kultivierung in beiden Hydrogelmatrices nachgewiesen. *PYK2* wurde in keiner Zelllinie durch die 3D-Kultivierung signifikant beeinflusst. Für die Berechnung der relativen Expression wurde die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode angewendet und der Mittelwert  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe einer one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Posttest und stellt signifikante Veränderungen zu den 2D-kultivierten Zellen dar. \*  $p < 0,05$ .

Um einen möglichen Abbau der Proteine durch die Kollagenase-Behandlung während der Zellisolation aus der 3D-Matrix auszuschließen, wurden 2D-kultivierte H358- und H23-Zellen ebenfalls für 45 min mit unterschiedlichen Kollagenase-Konzentrationen (0-1,5 mg/ml) behandelt. Eine anschließende proteinbiochemische Analyse zeigte, dass durch den Kollagenase-Verdau keine Reduktion der Proteinmenge der analysierten Proteine ( $\alpha$ -Catenin, Vinculin,  $\beta$ -Aktin, GAPDH) beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Da der fehlende Nachweis vieler Proteine nach dem Wachstum in einer Kollagen I-Matrix nicht durch eine Degradation des Lysates erklärt werden konnte, wurde die Transkriptmenge zweier exemplarischer Gene (*CTNNB1* ( $\beta$ -Catenin), *PTK2B* (Pyk2)) mittels qRT-PCR untersucht und auf die Transkriptmenge von GAPDH normiert.

Die Kultivierung von H358-Zellen in einer 3D-Matrigel- oder 3D-Kollagen I-Matrix bewirkte keine signifikanten Änderungen in der mRNA-Menge von *CTNNB1*. Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Reduktion der *CTNNB1*-mRNA durch die 3D-Kultivierung der H23-Zellen nachgewiesen (Matrigel:  $0,60 \pm 0,23$ ; Kollagen I:  $0,45 \pm 0,09$ ). Diese Reduktion fiel in den Kollagen I-kultivierten H23-Zellen stärker aus als in den Matrigel-kultivierten Zellen. Dennoch wurden in allen qRT-PCRs deutliche Mengen des *CTNNB1*-Transkripts in beiden Zelllinien nachgewiesen (Ct-Werte bei ca. 23 Zyklen). Die Reduktion der *CTNNB1*-mRNA durch die 3D-Kultivierung der H358- und H23-Zellen in einer Kollagen I-Matrix kann also nicht vollständig den fehlenden Proteinnachweis erklären (Abbildung 31B).

Die Transkription von *PYK2*, einem Familienmitglied von FAK, wurde als weiteres Beispiel für eine Reduktion der mRNA-Menge durch die 3D-Kultivierung untersucht. Dabei wurde weder für die H358- noch für die H23-Zellen eine signifikante Änderung der *PYK2*-mRNA durch die 3D-Kultivierung nachgewiesen (Abbildung 31C).

Mit diesen Versuchen wurde gezeigt, dass die 3D-Kultivierung von H358- und H23-Zellen in einer Matrigelmatrix zu einer Reduktion mesenchymaler Markerproteine führte, die in den H23-Zellen durch eine Zunahme der E-Cadherin-Proteinmenge begleitet wurde.

#### **6.14 Die 3D-Kultivierung bewirkte eine Reduktion der ZEB2-Expression**

Die Expression von epithelialen und mesenchymalen Markerproteinen wird unter anderem durch klassische EMT-induzierende Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 und Twist reguliert.

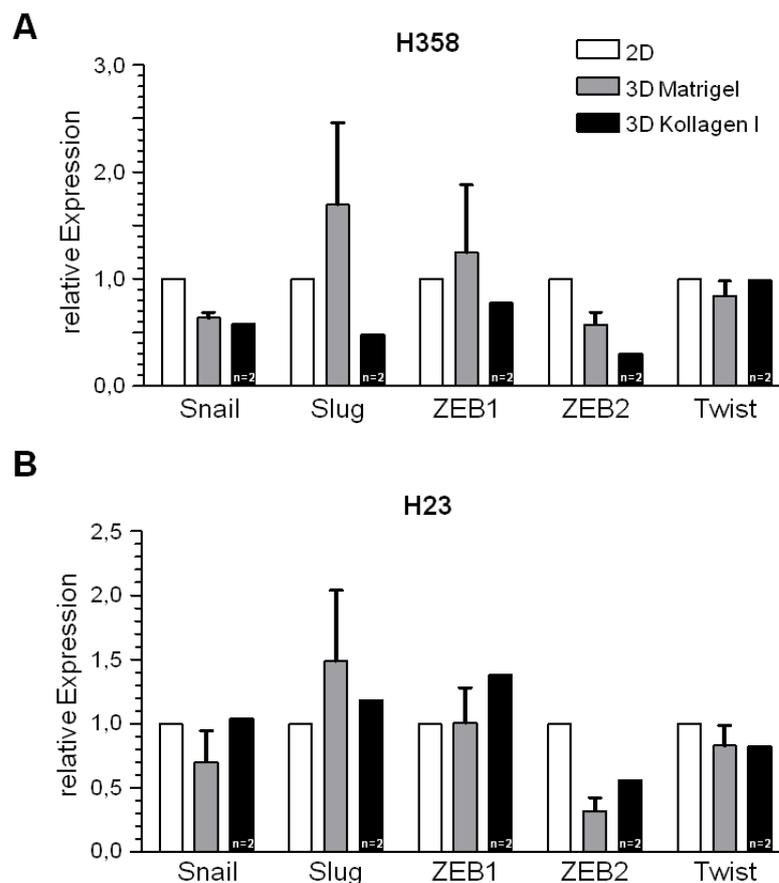
Um den Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren auf die 3D-kultivierten H358- und H23-Zellen zu analysieren, wurde deren Transkriptmenge mittels qRT-PCRs analysiert.

Die 3D-Kultivierung in einer Matrigel- oder Kollagen I-Matrix führte zu keinen Änderungen der *ZEB1*- und *Twist*-mRNA-Menge in den H358- und H23-Zellen (Abbildung 32A, B). Die 3D-Kultivierung der H358-Zellen bewirkte in beiden Hydrogelmatices eine Reduktion der *Snail*-mRNA und die 3D-Kultivierung in einer Kollagen I-Matrix reduzierte die *Slug*-mRNA-

Menge um ca. 50 % (Abbildung 32A).

Der mRNA-Menge des EMT-induzierende Transkriptionsfaktors *ZEB2* wurde durch die 3D-Kultivierung beider Zelllinien in einer Matrigel- oder Kollagen I-Matrix reduziert (Abbildung 32A, B).

Die Reduktion der *Slug*-mRNA in den Kollagen I-kultivierten H358-Zellen und die Reduktion der *ZEB2*-mRNA in 3D-kultivierten H358- und H23-Zellen korrelierte mit einer Herunterregulation mesenchymaler Markerproteine durch die 3D-Kultivierung der beiden Zelllinien und der Zunahme des epithelialen Markerproteins E-Cadherin in den Matrigel-kultivierten H23-Zellen (Abbildung 31A, Abbildung 32).

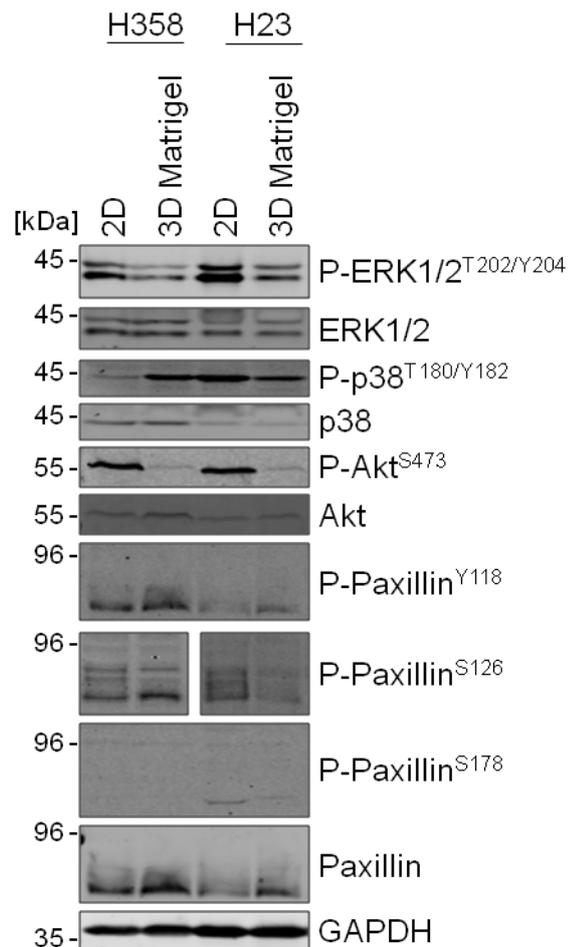


**Abbildung 32: Effekte der 3D-Kultivierung auf die mRNA-Menge von EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren.**

Die mRNA-Menge der EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 und Twist wurden in **[A]** H358- und **[B]** H23-Zellen mittels qRT-PCR untersucht, die in einer 3D-Hydrogelmatrix kultiviert wurden. **[A]** In den H358-Zellen bewirkte die Matrigelkultivierung eine Herunterregulation von *Snail* und *ZEB2* und die Kollagen I-Kultivierung reduziert die Konzentration von *Snail*, *Slug* und *ZEB2*. **[B]** In H23-Zellen bewirkte die Kultivierung in einer Matrigel- oder Kollagen I-Matrix eine Reduktion der *ZEB2*-mRNA. Für die Berechnung der relativen Expression wurde die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode verwendet und der Mittelwert  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten bzw. der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten aufgetragen.

## 6.15 Änderungen der Signaltransduktion durch die 3D-Kultivierung in einer Matrigelmatrix

Die 3D-Kultivierung der Zellen mithilfe der magnetischen Levitation zeigte deutliche Änderungen in der Signaltransduktion (Abbildung 29C). Im folgenden Experiment wurde daher der Einfluss der Matrigelmatrix auf die Signaltransduktion der 3D-kultivierten Zellen analysiert.



**Abbildung 33: Effekte der 3D-Kultivierung in einer Matrigelmatrix auf die Signaltransduktion.**

H358- und H23-Zellen, die in einer Matrigelmatrix kultiviert wurden, wurden auf eine veränderte Aktivität mehrerer Proteinkinasen untersucht. Dabei wurde in beiden Zelllinien eine Reduktion der ERK1/2- und der Akt-Phosphorylierung durch die 3D-Kultivierung beobachtet. Die p38-Aktivität und die beiden Paxillin-Phosphorylierungen Y118 bzw. S126 wurden in den H358- verstärkt und in den H23-Zellen verstärkt bzw. reduziert nachgewiesen. Die GAPDH-Färbung diente als Beladungskontrolle. Es wurden mindestens vier unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt.

Im Gegensatz zur magnetischen Levitation bewirkte die 3D-Matrigel-Kultivierung in beiden Zelllinien eine deutliche Reduktion der ERK1/2-Aktivität verglichen mit den 2D-kultivierten Zellen (Abbildung 33).

Die p38-Aktivität ist in beiden Zelllinien durch die Matrigel-Kultivierung unterschiedlich reguliert: In den H358 wurde die aktivierende Phosphorylierung von p38 wie schon bei den magnetisierten Sphäroiden verstärkt nachgewiesen, während die p38-Phosphorylierung in

den H23-Zellen durch die 3D-Kultivierung reduziert vorlag (Abbildung 33).

Die Akt-Phosphorylierung wurde durch eine 3D-Kultivierung in einer Matrigelmatrix, wie schon durch die 3D-Kultivierung mittels magnetischer Levitation, deutlich reduziert (Abbildung 33).

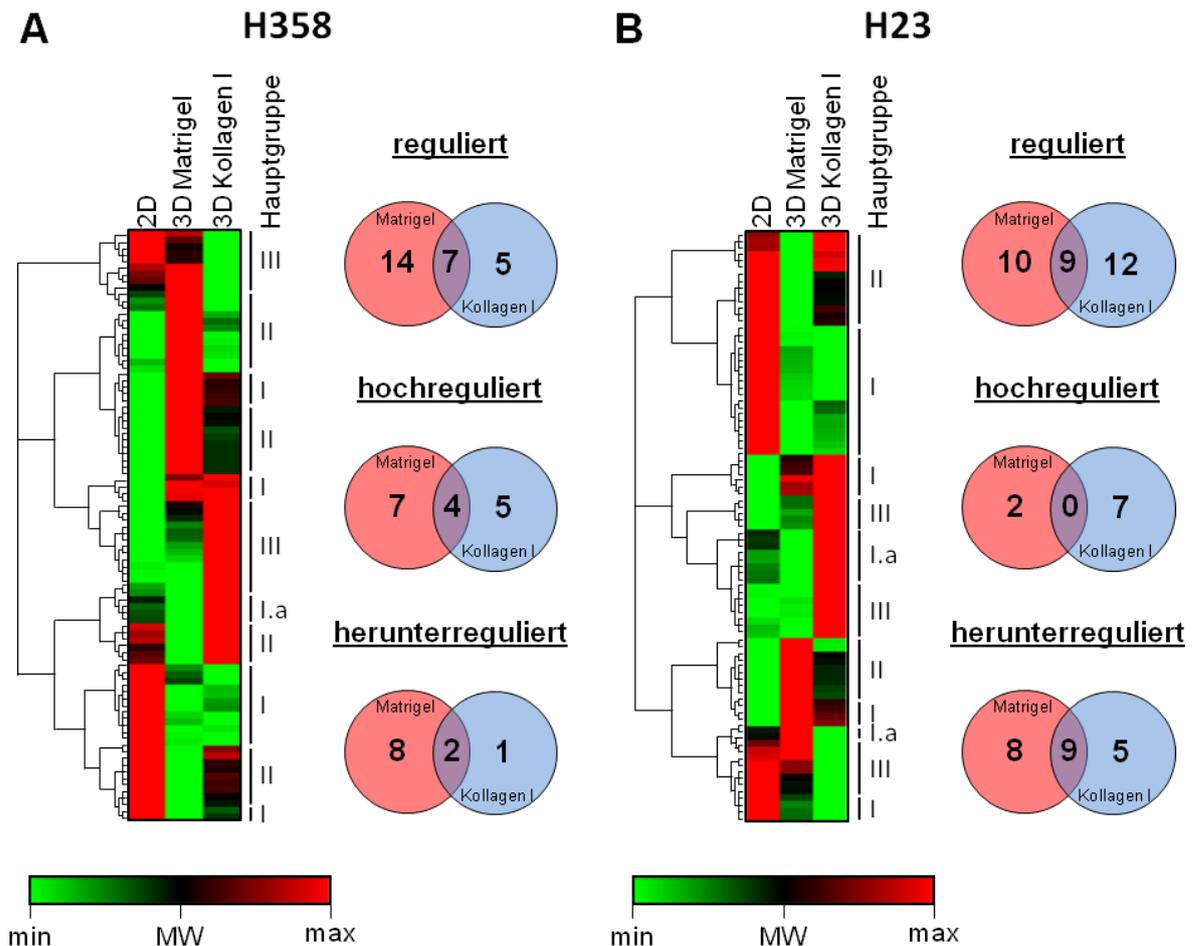
Des Weiteren wurde in den 3D-Matrigel-kultivierten Zellen die Funktion von Paxillin in den Integrin-abhängigen Zell/Matrix-Kontakten näher analysiert. Dabei wurde eine Zunahme der totalen Paxillin-Konzentration in den 3D-kultivierten H23-Zellen beobachtet (Abbildung 33). Darüber hinaus wurden dieselben Phosphorylierungsstellen analysiert wie nach der 3D-Kultivierung mithilfe der magnetischen Levitation (siehe 6.12.1). Dabei wurde in den 3D-kultivierten H358-Zellen ein größerer Anteil an Y118- und S126-phosphoryliertem Paxillin nachgewiesen verglichen mit den 2D-kultivierten Zellen. Die 3D-Kultivierung der H23-Zellen bewirkte eine Zunahme an Y118-phosphoryliertem und eine Abnahme an S126-phosphoryliertem Paxillin (Abbildung 33).

## 6.16 Genexpressionsanalysen identifizieren unterschiedlich regulierte Gen-Sets in 3D-kultivierten H358- und H23-Zellen

Da im Hydrogelmatrix-Modell der Einfluss der EZM bestimmt werden konnte, wurde auf transkriptioneller Ebene mithilfe des RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array „Extrazelluläre Matrix- & Adhäsionsmoleküle“ 87 Gene in 3D-kultivierten H358- und H23-Zellen analysiert, die an der Ausbildung von Zellkontakten und der Organisation der EZM beteiligt sind. Im Rahmen der anschließenden Analyse (Auswertungssoftware, Qiagen) wurde eine hierarchische Clusteranalyse (*non-supervised hierarchical clustering*) durchgeführt, bei der zunächst für jedes Gen die relative Expression aus allen drei Arrays gemittelt und die jeweiligen Expressionslevel in Relation dazu dargestellt wurden (*Heatmap*, Abbildung 34A, B).

Anhand dieser *Heatmaps* wurden optisch mehrere Hauptgruppen definiert:

- Hauptgruppe I: Gene, die verglichen mit 2D-kultivierten Zellen durch die Kultivierung in beiden Hydrogelmatrices hoch- bzw. herunterreguliert wurden
- Hauptgruppe I.a: Gene, die verglichen mit den 2D-kultivierten Zellen durch die Kultivierung in den Hydrogelmatrices entgegengesetzt reguliert wurden
- Hauptgruppe II: Gene, die verglichen mit 2D-kultivierten Zellen nur durch die Kultivierung in einer Matrigelmatrix hoch- bzw. herunterreguliert wurden
- Hauptgruppe III: Gene, die verglichen mit 2D-kultivierten Zellen nur durch die Kultivierung in einer Kollagen I-Matrix hoch- bzw. herunterreguliert wurden



**Abbildung 34: Genexpressionsanalyse der extrazellulären Matrixproteine und Adhäsionsmoleküle in 3D-kultivierten H358- und H23-Zellen.**

Mithilfe des RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays „Extrazelluläre Matrixproteine und Adhäsionsmoleküle“ wurde die Expression von 87 Genen in **[A]** H358- und **[B]** H23-Zellen analysiert, die in einer 3D-Hydrogelmatrix kultiviert wurden. Dabei wurde für jedes Gen die mittlere relative Expression bestimmt und in Relation dazu das Expressionslevel jeder Kultivierungsmethode in einer *Heatmap* dargestellt. Dabei wurden optisch Hauptgruppen (I, I.a, II, III) definiert, bei denen die verschiedenen 3D-Kultivierungsmethoden verglichen mit der 2D-Kultivierung unterschiedliche Effekte zeigten. Hauptgruppe I bzw. I.a enthalten Gene, die verglichen mit den 2D-kultivierten Zellen in beiden Hydrogelmatrices hoch- oder herunterreguliert wurden bzw. in der einen Hydrogelmatrix hoch- und in der anderen Matrix herunterreguliert wurden. Hauptgruppe II beinhaltet Gene, die verglichen mit den 2D-kultivierten Zellen nur durch die Kultivierung in einer Matrigelmatrix hoch- oder herunterreguliert wurden. Hauptgruppe III enthält Gene, die verglichen mit den 2D-kultivierten Zellen nur durch die Kultivierung in einer Kollagen I-Matrix hoch- oder herunterreguliert wurden.

Ab einem 2-fachen Unterschied in der relativen Expression zwischen den 2D- und 3D-kultivierten Zellen wurden die Gene als reguliert definiert. In den Venn-Diagrammen ist die Anzahl und Regulation der Gene dargestellt. Die Daten wurden mithilfe der Auswertungssoftware von Qiagen generiert.

Des Weiteren wurde die relative Expression der jeweiligen Gene auf die relative Genexpression von 2D-kultivierten Zellen normiert. Dabei wurde ein 2-facher Unterschied als Schwellenwert für eine Regulation des Genes durch die 3D-Kultivierung definiert.

In den H358-Zellen wurden 26 der 87 analysierten Gene durch die 3D-Kultivierung in einer der beiden Hydrogelmatrices differenziell zu 2D-kultivierten Zellen reguliert (Abbildung 39A). Von diesen 26 Genen wurden 14 durch die Matrigel-Kultivierung und 5 durch die Kollagen I-Kultivierung hoch- bzw. herunterreguliert. Interessanterweise wurden 7 Gene identifiziert, die in beiden Hydrogelmatrices unterschiedlich zu den 2D-kultivierten Zellen reguliert wurden.

Eine Aufteilung in hoch- und herunterregulierte Gene zeigte, dass in den Matrigel-kultivierten H358-Zellen ähnliche viele Gene hoch- und herunterreguliert (7 hoch, 8 herunter) wurden, während in den Kollagen I-kultivierten Zellen eher eine Hochregulation der analysierten Gene nachweisbar war (5 hoch, 1 herunter) (Abbildung 34A, Abbildung 39A).

Durch die 3D-Kultivierung der H23-Zellen wurden 31 der 87 analysierten Gene differenziell gegenüber den 2D-kultivierten Zellen reguliert (Abbildung 39B). Davon wurden 10 Gene ausschließlich durch die Matrigel-Kultivierung, 12 Gene ausschließlich durch die Kollagen I-Kultivierung und 9 Gene durch beide Hydrogelmatrices reguliert.

Die Aufteilung in hoch- und herunterregulierte Gene zeigte, dass die Kultivierung in einer Matrigelmatrix mehr Gene herunter- als hochreguliert (2 hoch, 8 herunter) und die Kultivierung in einer Kollagen I-Matrix ähnlich viele Gene hoch- wie herunterregulierte (7 hoch, 5 herunter). Auffällig ist, dass alle Gene, die durch die Kultivierung in beiden Hydrogelmatrices reguliert wurden reduzierte mRNA-Mengen aufwiesen (0 hoch, 9 herunter) (Abbildung 34B, Abbildung 39B).

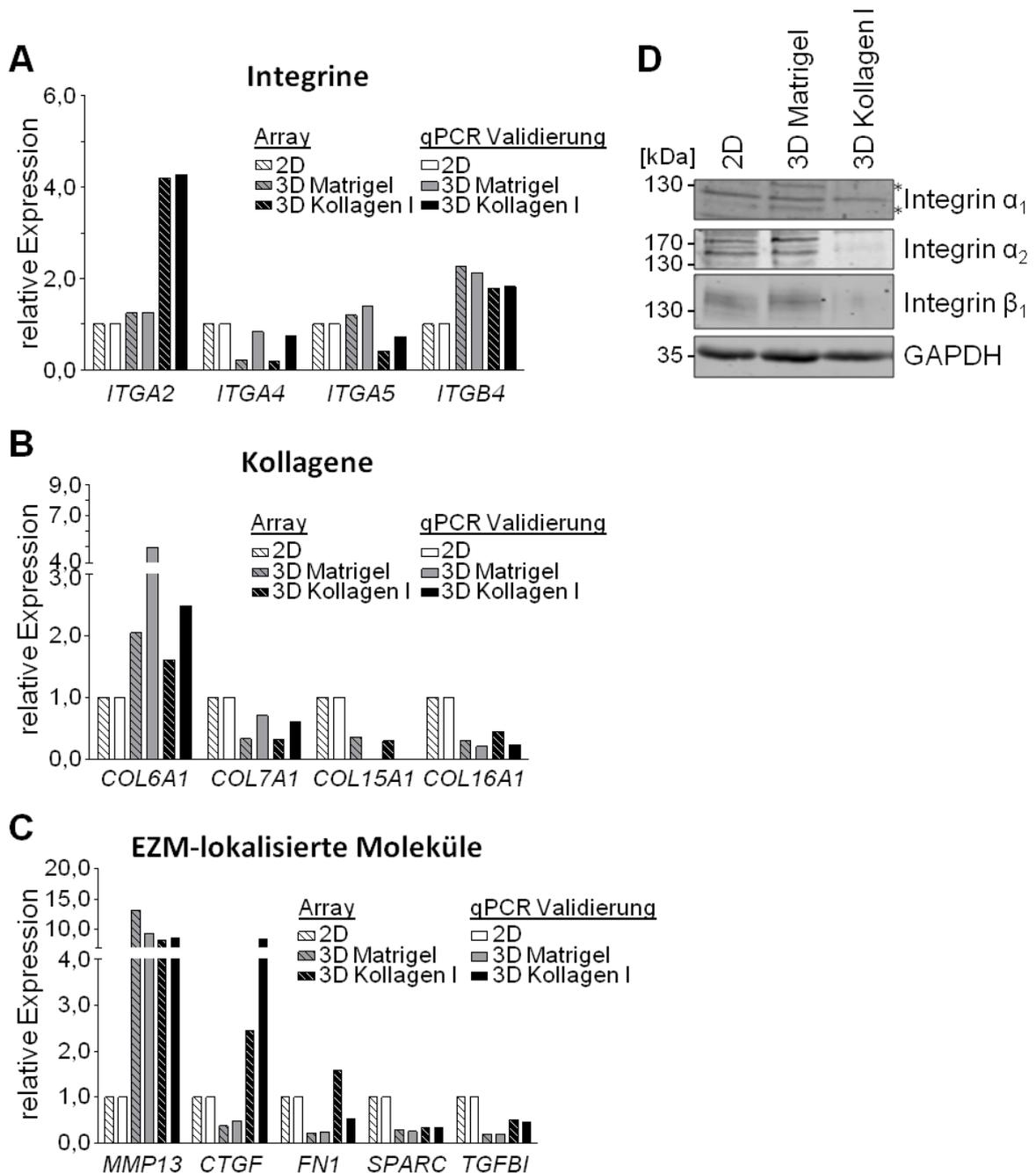
## 6.17 Die Validierung der RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array-Daten

### 6.17.1 H358 PCR Arrays

Die Genexpressionsanalyse aus Abbildung 34 wurde mit je einer cDNA durchgeführt um potenzielle Zielgene zu identifizieren, die durch die 3D-Kultivierung differenziell reguliert wurden. Die dabei identifizierten Zielgene wurden daher beispielhaft mit zwei cDNA-Proben und unabhängig erstellten Primersequenzen mittels qRT-PCRs erneut analysiert, um die Genexpressionsanalyse zu validieren. Dabei handelte es sich um die Gene von vier Integrinen (*ITGA2*, *ITGA4*, *ITGA5*, *ITGB4*), vier Kollagenen (*COL6A1*, *COL7A1*, *COL15A1*, *COL16A1*) und fünf weitere, EZM-assoziierten Molekülen (*MMP13*, *CTGF*, *FN1*, *SPARC*, *TGFBI*).

Eine Analyse der vier Integrine zeigte eine Übereinstimmung zwischen den Daten des RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays und den Daten der Validierungs-qRT-PCRs. Eine Ausnahme bildete hier *ITGA4*, das in den qRT-PCRs keine reduzierte mRNA-Menge aufwies. Aufgrund dieser Daten wurden erhöhte *ITGA2*- sowie reduzierte *ITGA5*-Transkriptmengen durch die 3D-Kollagen I-Kultivierung nachgewiesen. Außerdem wurde eine erhöhte *ITGB4*-Transkriptmenge durch die 3D-Kultivierung in beiden Hydrogelmatrices bestätigt (Abbildung 35A).

Die Ergebnisse von drei der vier analysierten Kollagene bestätigten die Ergebnisse des RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays. Diese qRT-PCRs bestätigten eine erhöhte *COL6A1*- und eine reduzierte *COL7A1*-, *COL15A1*- und *COL16A1*-Transkriptmenge in 3D-kultivierten H358-Zellen unabhängig von der Hydrogelmatrix (Abbildung 35B).



**Abbildung 35: Validierung der PCR Array-Ergebnisse in den H358-Zellen.**

[A, B, C] Einige der Gene aus dem PCR Array wurden durch weitere, unabhängige qRT-PCRs validiert. Dabei zeigten die meisten Gene in den Validierungs-qRT-PCRs eine ähnliche Regulation wie im PCR Array. *ITGA4* wurde in den qRT-PCRs nicht erfolgreich validiert. Für die Berechnung der relativen Expression wurde die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode verwendet und der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten aufgetragen. Die relativen Expressionsdaten, die mithilfe des PCR Arrays generiert wurden, sind vergleichend abgebildet (gestreifte Balken). [D] Drei Integrine wurden auf Proteinebene zur Validierung untersucht. Integrin  $\alpha_2$  und Integrin  $\beta_1$  waren in Kollagen I-kultivierten H358-Zellen nicht nachweisbar und wurden daher nicht zur Validierung herangezogen. Die in Matrigel-kultivierten Zellen zeigten eine unveränderte Integrin-Proteinkonzentration und validierten die Ergebnisse des PCR Arrays für Integrin  $\alpha_2$  und  $\beta_1$ . GAPDH diente als Beladungskontrolle. \* unspezifische Banden. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt.

Das Ergebnis des RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays wurde für die fünf EZM-assoziierten Moleküle mit Ausnahme von *FN1* in Kollagen I-kultivierten H358-Zellen ebenfalls bestätigt. Dabei bewirkten beide Hydrogelmatrices eine erhöhte mRNA-Menge von *MMP13* und eine

reduzierte Transkriptmenge von *SPARC* und *TGFBI*. Die *CTGF*-mRNA wurde durch die Matrigel-Kultivierung reduziert und durch die Kollagen I-Kultivierung erhöht, während *FN1* in den Matrigel-kultivierten H358-Zellen eine reduzierte Transkriptmenge aufwies (Abbildung 35C).

Neben der Validierung mittels qRT-PCR wurde zusätzlich die Proteinkonzentration einiger Integrine (Integrin  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ) in den 3D-kultivierten H358-Zellen überprüft. Dabei bewirkte die Matrigel-Kultivierung in dem gewählten Zeitraum für keines der drei Integrine eine Änderung der Proteinmengen. Dies bestätigte für Integrin  $\alpha_2$  und  $\beta_1$  die Ergebnisse des RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays, bei dem keine deutliche Änderung in der *ITGA2*- und *ITGB1*-Transkriptmenge festgestellt wurde. Die *ITGA1*-mRNA-Menge stieg jedoch auf das 4,3-fache an, was im Western Blot nicht nachgewiesen wurde. Die Proteine der Kollagen I-kultivierten H358-Zellen war, wie zuvor schwer oder überhaupt nicht nachweisbar, was hier durch die Integrin-Färbungen noch einmal bestätigt wurde (Abbildung 35D).

### 6.17.2 H23 PCR Arrays

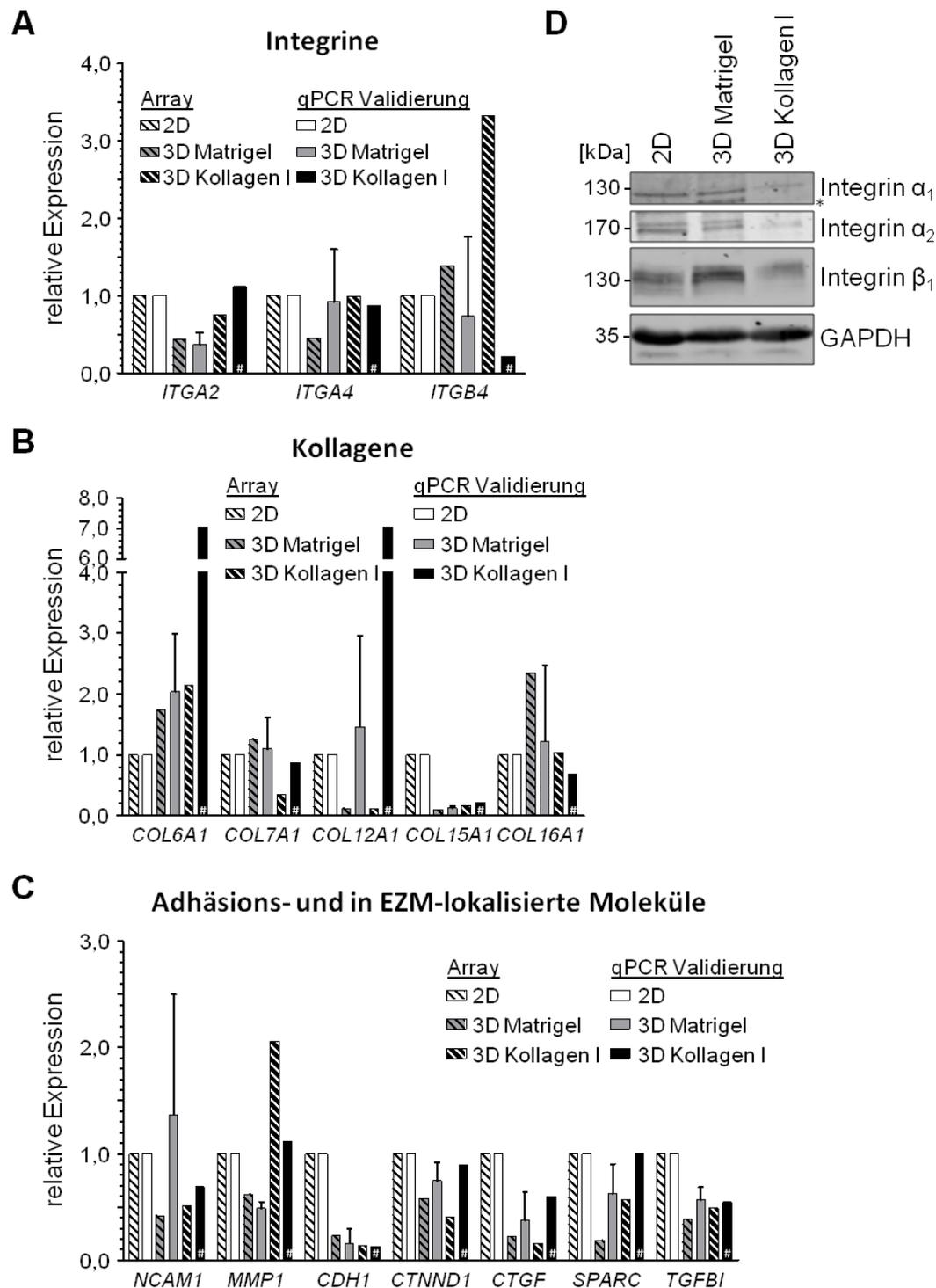
Um die beobachteten Effekte des RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays in den unterschiedlich kultivierten H23-Zellen zu validieren, wurden die Ergebnisse für einige exemplarische Gene mit unabhängig erstellten Primersequenzen und drei verschiedenen cDNAs mittels qRT-PCR überprüft.

Für diese Zelllinie wurden die Gene dreier Integrine (*ITGA2*, *ITGA4*, *ITGB4*) untersucht, die in den PCR Arrays mindestens 2-fach reguliert wurden. Für *ITGA2* und *ITGA4* wurden die Ergebnisse in beiden Hydrogelmatrixen bestätigt, während die Transkriptmenge von *ITGB4* lediglich durch die 3D-Matrigel-Kultivierung die PCR Arrays unterstützt. Die Validierung von *ITGB4* zeigte in den Kollagen I-kultivierten Proben deutliche Abweichungen: Im PCR Array wurde eine 3-fach erhöhte und in der anschließenden Validierung eine 80 % reduzierte mRNA-Menge nachgewiesen (Abbildung 36A).

Eine qRT-PCR-basierte Validierung ausgewählter Kollagene (*COL6A1*, *COL7A1*, *COL12A1*, *COL15A1*, *COL16A1*) bestätigte für *COL6A1* eine Hoch- und für *COL15A1* eine Herunterregulation durch die 3D-Kultivierung in beiden Hydrogelmatrixen (Abbildung 36B). Außerdem wurde bestätigt, dass die 3D-Matrigel-Kultivierung auf die *COL7A1*-mRNA-Menge und die 3D-Kollagen I-Kultivierung auf die *COL16A1*-Transkriptmenge keinen Einfluss nimmt (Abbildung 36B).

Die qRT-PCR-Ergebnisse der Kollagen I-kultivierten H23-Zellen auf *COL7A1* und *COL12A1* sowie der Matrigel-kultivierten Zellen auf *COL12A1* und *COL16A1* bestätigten nicht die Daten des PCR Arrays (Abbildung 36B).

In Abbildung 36C sind weitere Gene, die für die Validierung des PCR Arrays herangezogen wurden, abgebildet (*NCAM1*, *MMP1*, *CDH1*, *CTNND1*, *CTGF*, *SPARC*, *TGFBI*). Dabei



**Abbildung 36: Validierung der RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array-Ergebnisse in den H23-Zellen.**

[A, B, C] Einige der Gene aus dem PCR Array wurden durch weitere, unabhängige qRT-PCRs validiert. *ITGA2*, *ITGA4*, *COL6A1*, *COL15A1*, *CDH1*, *CTGF* und *TGFBI* wurden in beiden Hydrogelmatrices erfolgreich validiert. Für die Berechnung der relativen Expression wurde die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode verwendet und der Mittelwert  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten bzw. der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten (#) aufgetragen. [D] Drei Integrine wurden auf Proteinebene zur Validierung herangezogen. Die Integrin-Proteinkonzentrationen wurden durch die Kollagen I-Kultivierung der H23-Zellen deutlich reduziert. Die in Matrigel-kultivierten H23-Zellen zeigten für Integrin  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  keine Regulation und für Integrin  $\beta_1$  eine leichte Zunahme der Proteinmenge. GAPDH diente als Beladungskontrolle. \* unspezifische Bande. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot dargestellt.

stimmte die Regulation der Gene *CDH1*, *CTGF* und *TGFBI* mit den Ergebnissen des PCR Arrays überein, wobei für alle drei Gene eine Herunterregulation durch die 3D-Kultivierung in beiden Hydrogelmatrixen beobachtet wurde (Abbildung 36C).

Für *MMP1*, *CTNND1* und *SPARC* wurden nur die Ergebnisse der Matrigel-kultivierten Zellen und für *NCAM1* nur die PCR Array-Ergebnisse der Kollagen I-kultivierten Zellen durch die unabhängigen qRT-PCRs bestätigt. Dabei wurde für *MMP1*, *CTNND1*, *SPARC* und *NCAM1* eine reduzierte mRNA-Menge durch die 3D-Kultivierung in der jeweiligen Hydrogelmatrix verglichen mit den 2D-kultivierten H23-Zellen nachgewiesen (Abbildung 36C).

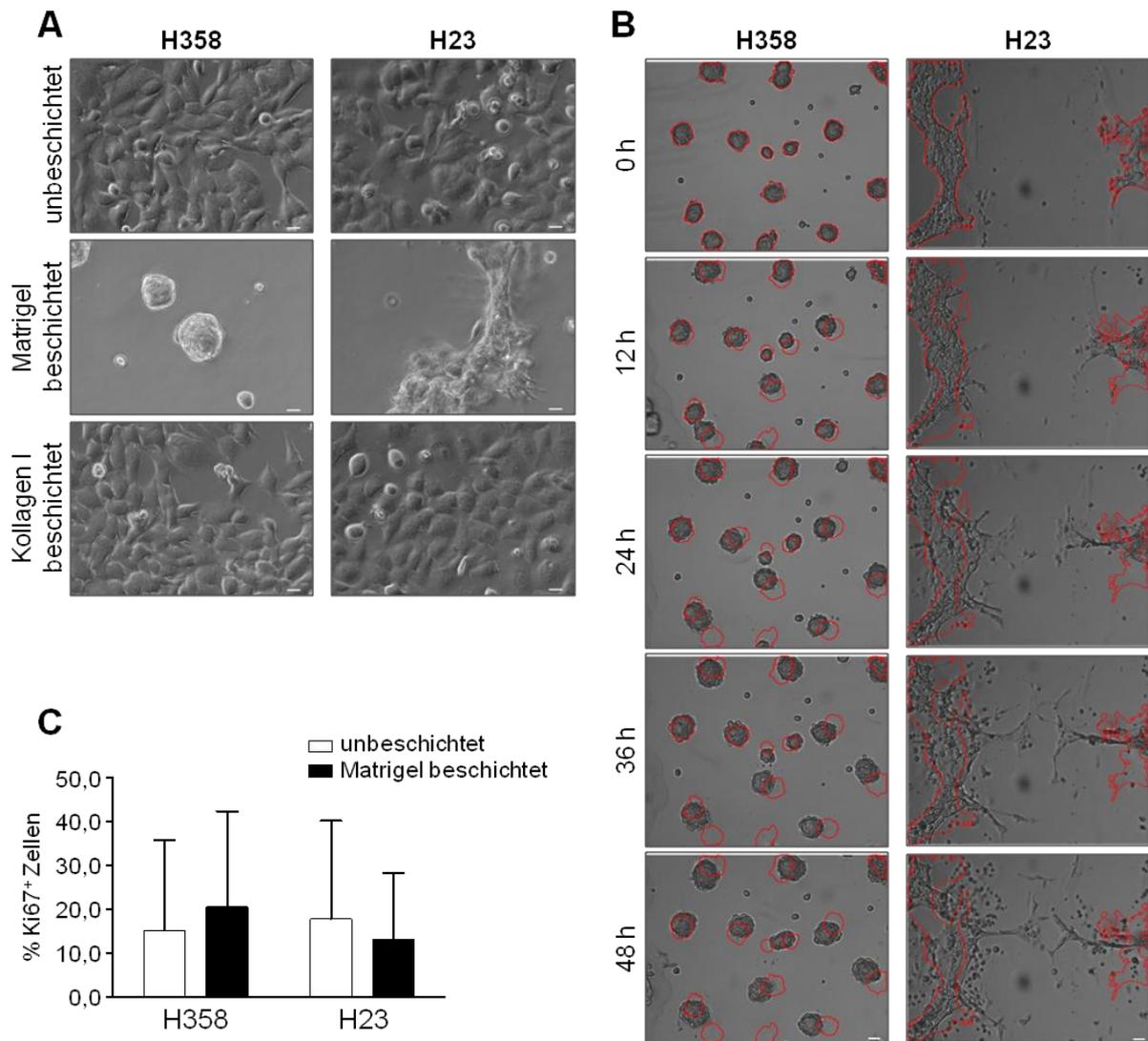
Wie schon in den H358-Zellen wurde auch in den H23-Zellen die Proteinkonzentration dreier Integrine untersucht. Dabei wurde in den Matrigel-kultivierten H23-Zellen für die Integrin  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Proteinmenge kein Unterschied nachgewiesen, während die Integrin  $\beta_1$ -Menge deutlich zugenommen hat. Die Ergebnisse des PCR Arrays wiesen eine reduzierte Transkriptmenge von *ITGA1*- und *ITGA2*- nach und keine Änderung in der *ITGB1*-mRNA-Menge. Die deutlichen Unterschiede zwischen den gemessenen mRNA- und Proteinmengen deuten auf weitere Mechanismen hin, die neben der transkriptionellen Regulation einen Einfluss auf die Proteinkonzentration der Integrine ausüben.

Für die Kollagen I-kultivierten H23-Zellen wurden alle drei analysierten Integrine mit geringer Intensität nachgewiesen. Verglichen mit den 2D-kultivierten H23-Zellen wurde die Proteinmenge aller drei Integrine durch die Kollagen I-Kultivierung reduziert. Im PCR Array wurde jedoch nur die Reduktion der *ITGA1*-mRNA durch die Kollagen I-Kultivierung nachgewiesen, während *ITGA2* und *ITGB1* durch die Kultivierungsart nicht beeinflusst wurden (Abbildung 36D).

Zusammenfassend zeigten die PCR Array-basierten und die qRT-PCR-basierten Genexpressionsanalysen in den 3D-kultivierten H358-Zellen eine sehr hohe Übereinstimmung (11/13 Gene positiv validiert), während diese in den 3D-kultivierten H23-Zellen größere Abweichungen aufzeigte (Matrigel-Kultivierung: 11/15 Gene positiv validiert; Kollagen I-Kultivierung: 8/15 Gene positiv validiert).

## 6.18 Ausbildung von 3D-Strukturen auf einer dünnen Matrigelschicht

Da die Manipulation und Analyse zellulärer Prozesse in 3D-kultivierten Zellen aufgrund der dicken Hydrogelmatrix erschwert sind, wurde eine modifizierte Variante der „3D on-top“-Kultivierung (siehe 3.4.2.5) etabliert, bei der H358- und H23-Zellen auf dünnen Matrigel- bzw. Kollagen I-Schichten kultiviert wurden. Dabei bildeten die Zellen 48 h nach der Aussaat auf einer dünnen Matrigelschicht 3D-Strukturen aus: Die H358-Zellen wuchsen in kompakten, kugelförmigen Kolonien und die H23-Zellen als wabenartiges Netzwerk mit größeren Zellaggregaten als Knotenpunkte (Abbildung 37A). Diese Strukturen ähneln den 3D-Strukturen, die die jeweiligen Zelllinien innerhalb einer 3D-Matrigelmatrix ausbildeten.



**Abbildung 37: Effekte der modifizierten „3D on-top“-Kultivierung auf H358- und H23-Zellen.**

**[A]** H358- und H23-Zellen wurden auf einer dünnen Matrigel- bzw. Kollagen I-Schicht ausgesät. Nach 2 Tagen auf einer Matrigelschicht bildeten die H358-Zellen kompakte, 3-dimensionale Zellkolonien und die H23-Zellen ein 3-dimensionales, wabenartiges Netzwerk aus. Die Kultivierung der Zellen auf Kollagen I-beschichteten Zellkulturschalen bewirkte keine Veränderung des zellulären Phänotyps. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ . **[B]** Um das Verhalten der Zellstrukturen näher zu untersuchen, wurden H358- und H23-Zellen auf einer dünnen Matrigel-Schicht ausgesät und am nächsten Tag alle 3 h dokumentiert. Die kompakten Zellkolonien der H358-Zellen pendelten über die Zeit um ihren ursprünglichen Platz. Die H23-Zellen bildeten neue Querverbindungen innerhalb des Netzwerkes aus. Die rote Umrandung stellt in jedem Bild den Zellumriss zum Zeitpunkt 0 h dar. Dieser Versuch wurde einmal mit mehreren Bildausschnitten durchgeführt. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 200  $\mu\text{m}$ . **[C]** H358- und H23-Zellen wurden auf Matrigel- bzw. unbeschichteten Zellkulturgefäßen ausgesät, mit PFA fixiert und mit anti-Ki67 und DAPI gefärbt. Die Ki67<sup>+</sup>-Zellen wurden ausgezählt um die Proliferationsrate der Zellen zu bestimmen. Dabei wurden keine Kultivierungsbedingten Unterschiede zwischen den Proliferationsraten der Zellen festgestellt. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt, bei denen jeweils 6 Gesichtsfelder ausgezählt wurden. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD.

Durch die Kultivierung der H358- und H23-Zellen auf einer dünnen Kollagen I-Schicht wurden keinen 3D-Strukturen ausgebildet. Die Zellen wuchsen als Monolayer auf der Kollagen I-Schicht und wiesen auch keine deutliche Änderung des Zellphänotyps auf (Abbildung 37A).

Um die Ausbildung der Strukturen sowie die Migrationsfähigkeit der Zellen genauer zu untersuchen, wurden H358- und H23-Zellen mit der modifizierten „3D on-top“-Kultivierungsmethode ausgesät und mit Zeit-aufgelöster Mikroskopie über 50 h alle 3 h dokumentiert. Die H358-Zellen bildeten, wie in Abbildung 37A gezeigt, kompakte Kolonien, die sich auf der dünnen Matrigelschicht kaum fortbewegten. Stattdessen pendelte die Zellkolonie in einem sehr engen Radius um ihre ursprüngliche Position (roter Umriss, Abbildung 37B).

Die auf einer dünnen Matrigelschicht-kultivierten H23-Zellen bildeten wie schon gezeigt ein wabenartiges Netzwerk aus (Abbildung 37A). In Bereichen, in denen die Zellen durch einen großen Zwischenraum voneinander getrennt sind, wurden nach und nach Quervernetzung von den H23-Zellen ausgebildet: Einzelne, langgezogene H23-Zellen wanderten in den Zwischenraum ein bis sie auf weitere, entgegenkommende Zellen trafen und Zell/Zell-Kontakte ausbildeten (Abbildung 37B).

Außerdem wurde die Proliferationsrate dieser Zellen bestimmt, die auf einer dünnen Matrigelschicht kultiviert wurden. Dafür wurden die Zellen mit PFA fixiert und mit anti-Ki67 und DAPI gefärbt. Der Anteil der Ki67<sup>+</sup>-Zellen wurde gezählt und daraus die Proliferationsrate bestimmt. Obwohl die Abweichung zwischen den Messungen sehr hoch war, wurde in keiner Zelllinie ein Unterschied in der Proliferationsrate durch die modifizierte „3D on-top“-Kultivierung verglichen mit den 2D-kultivierten Zellen nachgewiesen (Abbildung 37C).

## **6.19 Analyse des Differenzierungsverhaltens und der MAPK-Signaltransduktion im modifizierten „3D on-top“-Matrigel-Kultivierungsmodell**

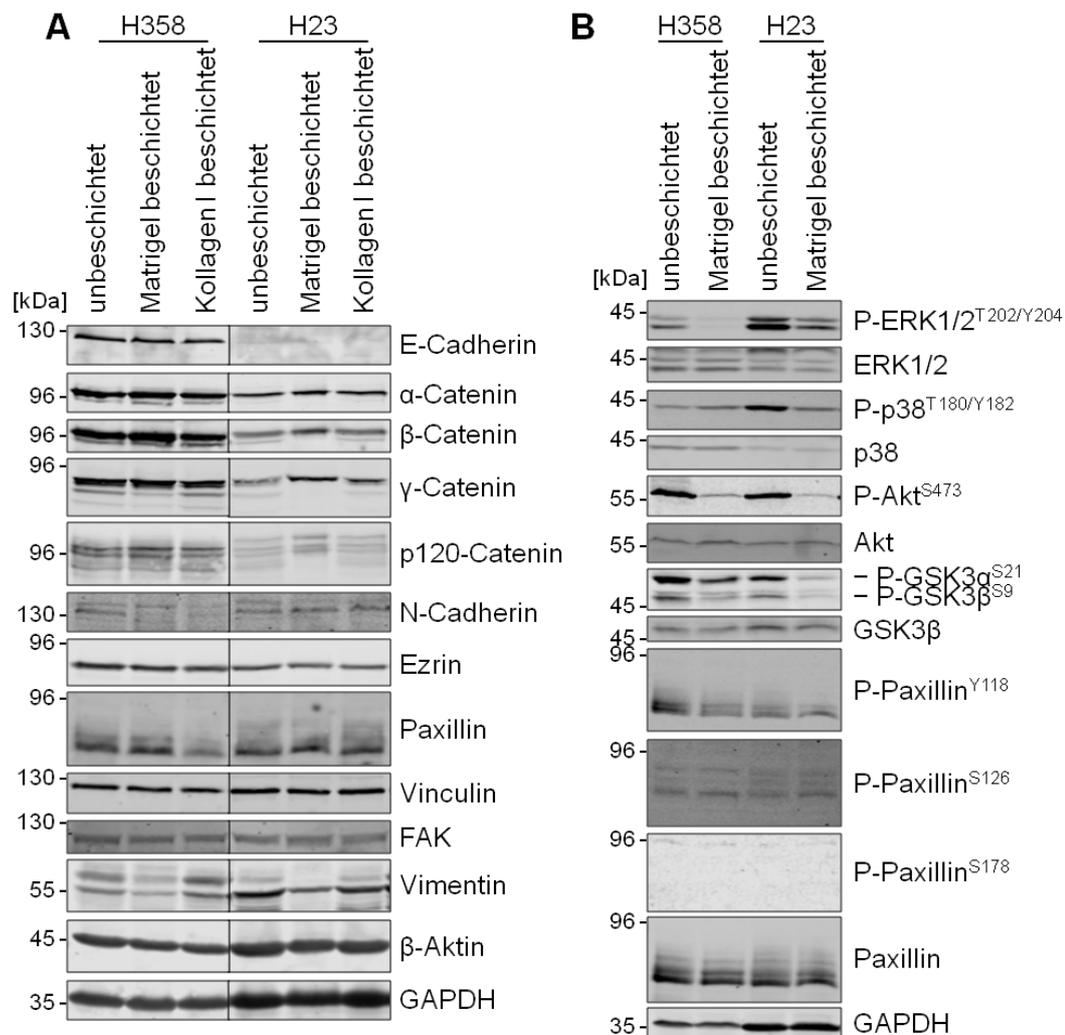
Um die modifizierte Variante der „3D on-top“-Kultivierung als vereinfachtes Kultivierungsmodell zu etablieren, wurden in den folgenden Versuchen die Effekte dieser Kultivierungsmethode auf die Differenzierung und Signaltransduktion von H358- und H23-Zellen charakterisiert und mit den Daten der 3D-Hydrogel-Kultivierung verglichen.

Die Kultivierung von H358-Zellen auf einer dünnen Matrigelschicht führte zu reduzierten Proteinmengen der mesenchymalen Markerproteine N-Cadherin und Vimentin (Abbildung 38A). Diese Abnahme der beiden Proteine wurde bereits für die 3D-Kultivierung der H358-Zellen in einer 3D-Matrigelmatrix nachgewiesen (Abbildung 31A). Die epithelialen Differenzierungsmarker E-Cadherin und  $\alpha$ -Catenin sowie Proteine des Cadherin-Adhäsionskomplexes ( $\beta$ -,  $\gamma$ -, p120-Catenin, Vinculin) sind durch die modifizierte „3D on-top“-Kultivierung nicht reguliert (Abbildung 38A).

Die Kultivierung der H23-Zellen auf einer dünnen Matrigel-Schicht bewirkte eine Zunahme der Proteinkonzentrationen der am Cadherin-Adhäsionskomplex beteiligten Proteine  $\beta$ -,  $\gamma$ -

und p120-Catenin, sowie eine Abnahme der mesenchymalen Vimentin-Mengen (Abbildung 38A). Dies bekräftigt zumindest für das mesenchymale Markerprotein Vimentin die Ergebnisse der 3D-Matrigel-Kultivierung (Abbildung 31A).

Somit zeigten beide Zelllinien eine epitheliale Differenzierung der Zellen durch die Kultivierung in bzw. auf einer dünnen Matrigel-Schicht.



**Abbildung 38: Effekte auf Differenzierungsmarker und Aktivität von Proteinkinasen durch die modifizierte „3D on-top“-Kultivierung der H358- und H23-Zellen.**

**[A]** Durch die Kultivierung der H358-Zellen auf einer dünnen Matrigelschicht wurden reduzierte N-Cadherin- und Vimentin-Proteinkonzentrationen nachgewiesen. Die dünne Kollagen I-Schicht bewirkte in den H358-Zellen eine Reduktion von N-Cadherin und Paxillin. In den H23-Zellen bewirkte die dünne Matrigelschicht eine leichte Zunahme von  $\beta$ -,  $\gamma$ - und p120-Catenin, sowie eine Abnahme von Vimentin. **[B]** Die dünne Matrigelschicht führte in H358- und H23-Zellen zu einer reduzierten ERK1/2-, Akt- und GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung. Die p38-Aktivität wurde Zelllinien-spezifisch einmal aktiviert und einmal inhibiert. Die Y118-Phosphorylierung von Paxillin wurde in H358-Zellen, die auf einer dünnen Matrigelschicht kultiviert wurden, verstärkt nachgewiesen verglichen mit H358-Zellen, die auf unbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert wurden. **[A, B]** Die GAPDH-Färbung diente als Beladungskontrolle. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt und ein repräsentativer Blot abgebildet.

Wie schon durch das Wachstum als 2D-Monolayer erwartet (Abbildung 37A), bewirkte die modifizierte „3D on-top“-Kultivierung auf einer dünnen Kollagen I-Schicht keine oder nur geringe Veränderungen in den analysierten epithelialen und mesenchymalen Proteinen: In

den H358-Zellen wurde eine Reduktion der N-Cadherin- und Paxillin-Proteinmengen beobachtet, während in den H23-Zellen keine Unterschiede festgestellt wurden (Abbildung 38A).

Neben der Analyse des Differenzierungsstatus der Zellen wurden auch Veränderungen in der Aktivität mehrerer Proteinkinasen charakterisiert.

Dabei wurden bei der Analyse der Kinase-Aktivität ähnliche Effekte wie durch die 3D-Matrigel-Kultivierung beobachtet: Die ERK1/2- und Akt-Aktivität wurden durch die modifizierte „3D on-top“-Kultivierung inhibiert (Abbildung 38B).

Die p38-Aktivität wurde Zelllinien-spezifisch in H358-Zellen hoch- und in H23-Zellen herunterreguliert (Abbildung 38B).

Eine zusätzliche Analyse von GSK3 $\beta$  als nachgeschaltetes Signalmolekül von Akt wies ebenfalls eine reduzierte Phosphorylierung auf (Abbildung 38B).

Die Ausbildung der Zell/Matrix-Kontakte wurde mithilfe der verschiedenen Paxillin-Phosphorylierungsstellen weiter charakterisiert.

Die modifizierte „3D on-top“-Kultivierung auf einer dünnen Matrigel-Schicht beeinflusste nicht die Gesamtproteinmenge von Paxillin in den H358- und H23-Zellen (Abbildung 38B).

Diese Kultivierung bewirkte in den H358-Zellen eine erhöhte Menge an Y118-phosphoryliertem Paxillin (Abbildung 38B).

In den H23-Zellen wurden die Menge Y118-phosphoryliertem Paxillin nicht verändert, während eine leichte Zunahme an S126-phosphoryliertes Paxillin nachweisbar war (Abbildung 38B).

Die Regulation der Y118-Phosphorylierung in H358-Zellen und die Y118- und S126-Phosphorylierung in H23-Zellen unterschied sich von den Beobachtungen der 3D-Matrigel-kultivierten Zellen (Abbildung 33, Abbildung 38B).

Die S178-Paxillin-Phosphorylierung wurde durch die modifizierten „3D on-top“-Kultivierung in keiner der beiden Zelllinien nachgewiesen (Abbildung 38B).

Bei dieser modifizierten „3D on-top“-Kultivierung auf einer Matrigelmatrix handelte es sich um ein vereinfachtes Kultivierungsmodell, bei dem die Handhabung und Manipulation der Zellen simpel und die Kultivierungsdauer verkürzt ist verglichen mit der Hydrogel-basierten 3D-Kultivierung. Dabei induzierte die modifizierte „3D on-top“-Kultivierung auf einer Matrigelmatrix im Wesentlichen dieselben Effekte wie die 3D-Kultivierung in einer Matrigelmatrix: Die Induktion einer epithelialen Differenzierung, sowie Änderungen in der Aktivität der analysierten Proteinkinasen.

Durch die modifizierte „3D on-top“-Kultivierung auf einer dünnen Kollagen I-Schicht wurden keine 3D-Strukturen ausgebildet und keine Unterschiede in den Differenzierungsmarkern beobachtet.

## 7 Diskussion

### 7.1 Die Rolle von Rac1b in der Lungentumor-Progression

Die Rho-GTPase Rac1 ist in NSCLC-Patienten überexprimiert und erhöhte Rac1-Mengen korrelieren mit einer erhöhten Aggressivität des Tumors [12]. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen Rac1 und Rac1b wird in vielen Publikationen nicht zwischen den beiden Isoformen unterschieden, sodass Rac1b-spezifische Effekte in Lungentumoren kaum untersucht sind.

In NSCLC liegen die Onkogene K-Ras und EGFR häufig verändert vor und zählen daher zu den Treibermutationen in dieser Tumorart [138]. Die für diese Versuche verwendete H23-Zelllinie weist laut ATCC keine Mutation des EGFR, jedoch eine heterozygote, aktivierende K-Ras(G12C)-Mutation auf. Diese Zelllinie wurde aufgrund ihrer geringen endogenen Rac1b-Proteinmengen ausgewählt (Abbildung 17). In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Rac1b auf die Proliferation, Migration, Differenzierung und Genexpression mithilfe der ektopen Expression der Rho-GTPasen untersucht. Man kann daher davon ausgehen, dass die beobachteten Effekte durch das ektopye EGFP-Rac1b- bzw. EGFP-Rac1-Protein hervorgerufen wurden. Dabei wurden die EGFP-Rac-Fusionsproteine einerseits transient exprimiert, wodurch aufgrund der kurzen Expressionsdauer (ca. 24 h) potenzielle Zielproteine in der Signaltransduktion identifiziert werden können. Andererseits wurde durch die stabile Expression der EGFP-Rac-Proteine, die Expressionsdauer in den Zellen deutlich verlängert. Mit diesem Modell wurden potenzielle zelluläre Anpassungseffekte der langanhaltenden EGFP-Rac-Expression berücksichtigt, wie sie auch in humanen Tumoren auftreten können.

#### 7.1.1 Effekte von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 auf die Proliferation

Zunächst wurde der Einfluss der beiden Rho-GTPasen Rac1 und Rac1b auf die Proliferation der NSCLC-Zelllinie H23 untersucht. Dabei bewirkten beide EGFP-Rac-Isoformen eine etwa 25 % schnellere Verdopplungsrate als die EGFP-exprimierenden Kontrollzellen. Bei einem direkten Vergleich der Proliferationsraten der EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klone wurden jedoch keine Unterschiede festgestellt (Abbildung 21A). Der pro-proliferative Effekt von Rac1 wurde bereits in Brustadenokarzinomen [139], Pankreaskarzinomen [140] und weiteren Tumorentitäten [141] nachgewiesen. Dagegen ist die Rac1b-abhängige Proliferation deutlich schlechter untersucht. In einem Mausmodell für K-Ras-induzierte Lungenadenokarzinome wurde für Rac1b eine Tumor-unterstützende Rolle nachgewiesen, die sich unter anderem in einer Steigerung der Proliferationsrate äußerte [14].

Um den beobachteten, pro-proliferativen Effekt der beiden Rac-Isoformen in den EGFP-Rac-exprimierenden H23-Klonen detaillierter zu analysieren, wurde zunächst die Aktivität der

MAPKs ERK1/2 überprüft, dessen zentrale Rolle in der Proliferation gut belegt ist [142]. Die ERK1/2-Aktivität war jedoch weder in den stabil, noch in den transient EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellen erhöht (Abbildung 18A, Abbildung 22A) und war daher wahrscheinlich nicht regulatorisch an der erhöhten Proliferation der EGFP-Rac-exprimierenden H23-Klone beteiligt.

Die MAPKs p38 und JNK1/2 gehören zwar nicht zu den Hauptregulatoren der Proliferation, können diese aber dennoch beeinflussen, indem sie z. B. den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren [143]. Dieser AP-1-Komplex ermöglicht die Transkription von Cyclin D1, einem Protein, das eine zentrale Rolle in der G<sub>1</sub>/S-Transition einnimmt [39]. Die Aktivierung dieser MAPKs durch EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1, die in dieser Arbeit beschrieben werden konnte, korrelierte mit einer erhöhten Proliferationsrate dieser Zellen. Dies deutet auf einen möglichen, positiven Einfluss dieser MAPKs auf die Proliferation in den EGFP-Rac-exprimierenden H23-Zellen hin (Abbildung 22A).

In der Kolonkarzinom-Zelllinie SW480 wurde ebenfalls eine gesteigerte Proliferation in Rac1b-überexprimierenden Zellen beobachtet, die mit einer Rac1b-abhängigen Aktivierung von JNK2 korrelierten [143] und so die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen unterstützen.

Um die Langzeit-Effekte von den Kurzzeit-Effekten durch die EGFP-Rac1b-Expression bezüglich der Proliferationskontrolle zu unterscheiden, wurde die Aktivität der MAPKs p38 und JNK1/2 auch in transient EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellen untersucht. In diesen Versuchen wurden jedoch bereits in den Kontrollvektor-transfizierten Zellen ein Anstieg der p38- und JNK1/2-Aktivität beobachtet (Abbildung 18A). Bei diesen MAPKs handelt es sich um Stress-induzierte Kinasen. Eine mögliche Erklärung für diese Kontrollvektor-induzierte Aktivierung stellt somit eine Stressreaktion der Zellen dar, die durch den Transfektionsvorgang hervorgerufen worden sein könnte [144]. Diese Stressreaktion könnte daher mögliche Effekte der kurzzeitigen Expression von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 auf die Aktivität dieser MAPKs überlagern. Somit können hier nur begrenzt Aussagen über eine mögliche Korrelation zwischen der p38- bzw. JNK1/2-Aktivität und der Regulation der Proliferation getroffen werden, die durch EGFP-Rac1b oder EGFP-Rac1 induziert werden könnten.

Bei einem weiteren Signalweg, der in der Regulation der Proliferation eine Rolle spielt, handelt es sich um den PI3K/Akt-Signalweg [145]. In den stabil EGFP-Rac1b- und in den EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klonen liegen die Proteinkinase Akt sowie dessen Effektor-Serin/Threonin-Kinase GSK3 $\beta$  verstärkt phosphoryliert vor (Abbildung 22A). Durch die Aktivierung des Akt-Signalweges wird GSK3 $\beta$  phosphoryliert und somit inhibiert. Dadurch bewirkt GSK3 $\beta$  eine Stabilisierung des Cyclin D1-Proteins, da es nicht mehr an Position T286 phosphoryliert und anschließend proteasomal degradiert werden kann [146].

Zusätzlich ist GSK3 $\beta$  als Teil des Wnt-Signalweges an der Degradation von  $\beta$ -Catenin beteiligt. Wird GSK3 $\beta$  inhibiert, so kann das nicht-phosphorylierte  $\beta$ -Catenin in den Zellkern translozieren und mit TCF/LEF unter anderem die Genexpression von Cyclin D1 aktivieren [147].

Da die kurzzeitige Expression von konstitutiv-aktivem HA-Rac1b(G12V) in H23-Zellen keine Aktivierung des Cyclin D1-Promotors bewirkte (Abbildung 18C), wurde der pro-proliferative Effekt wahrscheinlich durch die Inhibierung der GSK3 $\beta$ -abhängigen Destabilisierung des Cyclin D1-Proteins hervorgerufen.

Mithilfe der Triton X-100-Fraktionierung wurde in dieser Arbeit das an das Aktin-Zytoskelett-gebundene  $\beta$ -Catenin (Triton-unlösliche Fraktion, Abbildung 25), das wahrscheinlich an der Ausbildung von Zell/Zell-Kontakte beteiligt ist, von dem  $\beta$ -Catenin getrennt, das nicht lokalisiert war (Triton-lösliche Fraktion; Abbildung 25) und somit für die Signaltransduktion zur Verfügung stand. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die lang andauernde EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-Expression das an der Signaltransduktion-beteiligte  $\beta$ -Catenin erhöht war (Abbildung 25). Dies korreliert mit der beobachteten Zunahme der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung, die eine Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin bewirken kann, sodass  $\beta$ -Catenin im Zellkern die Genexpression beeinflussen kann [148].

Diese Ergebnisse weisen somit auf eine korrelative Beziehung zwischen den beiden EGFP-Rac-Isoformen und dem Wnt-Signalweg hin, die in der Regulation der Proliferation eine Rolle spielen könnte.

### **7.1.2 Antagonistische Effekte von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 auf die epitheliale Differenzierung**

Ein entscheidender Schritt bei der Progression zu einem Karzinom ist die Invasion in das umliegende Gewebe. Dafür nehmen die ursprünglich epithelialen Tumorzellen einen mesenchymalen Phänotyp an, was die Invasivität und die Motilität der Zellen steigert [149]. Die Induktion einer solchen EMT wurde in den stabil EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden Zellen untersucht, indem epitheliale und mesenchymale Markerproteine analysiert wurden (Abbildung 22B).

Eine Analyse der E-Cadherin-Proteinmenge zeigte zwischen den beiden stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klonen B1 und B3 deutliche Unterschiede. Während die E-Cadherin-Menge im B1-Klon vergleichbar mit der in den stabil EGFP-exprimierenden Kontrollzellen war, lag im B3-Klon weniger E-Cadherin vor (Abbildung 22B). Eine mögliche Erklärung für diese Heterogenität ist, dass im B3-Klon der Anteil der stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen schon nach kurzen Kultivierungszeiten auf ca. 70-80 % zurückging. Daher könnten die nicht-transfizierten, parental H23-Zellen die gemessenen E-Cadherin-Proteinmengen negativ beeinflussen. Der zweite EGFP-Rac1b-exprimierende Klon B1 bestand dagegen

ununterbrochen zu 95-100 % aus EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen, sodass die E-Cadherin-Menge in diesem Zellklon kaum durch parentale H23-Zellen beeinflusst werden konnte.

Weitere Analysen, bei denen Aktin-assoziierte Cadherin-Komplexe angereichert wurden, zeigten eine ähnlich heterogene E-Cadherin-Verteilung in den beiden EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klonen (Triton X-100-unlösliche Fraktion, Abbildung 25). Obwohl eine Abnahme der E-Cadherin-vermittelten Zell/Zell-Kontakte aufgrund der Klon-Heterogenität nicht ausgeschlossen werden kann, wurde in diesen EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klonen keine Zunahme der N-Cadherin-Proteinmenge gezeigt (Abbildung 25), die auf einen sog. *Cadherin switch* hindeuten könnte. Der *Cadherin switch* ist typisch für EMT-Vorgänge und begünstigt die Ausbildung von Zell/Zell-Kontakten mit mesenchymalen Zellen [150]. Außerdem wurde die Menge des am E-Cadherin-Adhäsionskomplex-beteiligten  $\beta$ -Catenin nicht verändert (Abbildung 25) und auch Immunfluoreszenz-Analysen wiesen keine Umverteilung von  $\beta$ -Catenin von der Membran ins Zytosol bzw. in den Kern nach (Abbildung 24A). Diese Beobachtungen zeigten, dass eine Überexpression von EGFP-Rac1b keine Induktion einer EMT in den H23-Zellen bewirkte. Diese Beobachtung wurde zusätzlich durch einen Vergleich der endogenen Rac1b-Proteinmenge in verschiedenen Zelllinien unterstützt, bei dem eine höhere Rac1b-Menge mit einem epithelialen Phänotyp der Zelllinien korrelierte (Abbildung 17).

Stallings-Mann *et al.* wiesen jedoch in einem transgenen Mausmodell eine Korrelation der Rac1b-Überexpression mit ausgewählten, mesenchymalen Differenzierungsmarkern nach, die eine Rac1b-abhängige EMT darstellt [15]. Dabei wurde jedoch keine simultane Überexpression von Rac1 überprüft, dessen Überexpression und EMT-induzierende Wirkung in Lungentumoren bekannt ist [12].

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen der erhöhten Rac1b-Expression und der Zunahme der mesenchymalen Differenzierungsmarker herzustellen, führte Stallings-Mann *et al.* [15] Ko-Lokalisations-Analysen durch, bei denen ein Rac1b-Antikörper verwendet wurde, für den in der vorliegenden Arbeit unspezifische Proteinbindungen nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den immunhistochemischen Rac1b-Färbungen von Stallings-Mann *et al.* [15] auch um unspezifische Proteinnachweise handelt und die beobachtete EMT nicht nur über Rac1b reguliert wurde.

In stabil EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klonen wurde mithilfe der Triton X-100-Fraktionierung ein *Cadherin switch* beobachtet, bei dem das an Zell/Zell-Kontakten-beteiligte E-Cadherin reduziert und die N-Cadherin-Menge erhöht vorlag (Abbildung 25). Durch die Expression unterschiedlicher Cadherine an der Zelloberfläche sondern sich die N-Cadherin-exprimierenden von den E-Cadherin-exprimierenden Zellen ab [150, 151]. Die erhöhte

Expression von N-Cadherin korreliert in den Tumorzellen mit einem Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp und führt zu einer Steigerung der zellulären Motilität [150, 152]. Die stabile Expression von EGFP-Rac1 kann somit in den H23-Zellklonen eine EMT induzieren.

Die Induktion einer EMT wurde zusätzlich in den transient EGFP-Rac-exprimierenden H23-Zellen untersucht. Dabei wurden mit Ausnahme der Vimentin-Proteinmenge keine Unterschiede in den analysierten Proteinen festgestellt (Abbildung 18B). Bei der EMT handelt es sich um einen langsamen Prozess in der Zelle, bei dem die Genexpression verändert und Proteine neu synthetisiert werden müssen. Die 24-stündige Expressionsdauer von EGFP-Rac1b bzw. EGFP-Rac1 sind daher offensichtlich nicht ausreichend um Konzentrationsänderungen in den hier analysierten Proteinen detektieren zu können.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass EGFP-Rac1 in den H23-Zellklonen eine *Cadherin switch* bewirkte und kann somit eine EMT in diesen Zellen induzieren. In den stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klonen wurde dagegen in einem von beiden Klonen eine leichte Reduktion der E-Cadherin-Proteinmenge nachgewiesen, während die N-Cadherin-Menge in beiden Klonen unverändert blieb. Es wurde demnach in dieser Arbeit gezeigt, dass EGFP-Rac1b im Gegensatz zu EGFP-Rac1 nicht in der Lage war, eine EMT in den H23-Zellklonen zu induzieren. Bei der Induktion einer EMT handelt es sich daher um einen EGFP-Rac1-spezifischen Effekt.

Es ist sogar möglich, dass EGFP-Rac1b während der EMT als Gegenspieler von EGFP-Rac1 fungieren kann. Die in dieser Arbeit analysierten Proteinkinasen zeigten jedoch keine unterschiedliche Phosphorylierung zwischen stabil EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen, die auf einen antagonistischen Effekt der beiden EGFP-Rac-Isoformen hinweisen würde. Es ist jedoch möglich, dass weitere, EMT-induzierende Effektorproteine durch EGFP-Rac1 aktiviert werden können, während EGFP-Rac1b diese Effektoren binden, aber nicht aktivieren kann. Diese Hypothese muss jedoch in aufbauenden Arbeiten überprüft werden.

### **7.1.3 Einfluss von EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 auf die Migration**

Neben dem Verlust des epithelialen Differenzierungsstatus nimmt die Motilität der Tumorzellen während der Tumorigenese zu und die Tumorzellen migrieren in das umliegende Gewebe [150]. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Effekt von EGFP-Rac1b auf die Migration in einer NSCLC-Zelllinie untersucht und mit den EGFP-Rac1-induzierten Effekten verglichen (Abbildung 21B). Dabei fiel erneut die Heterogenität der beiden stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klone auf: Der Klon B1 zeigte eine schwache Zunahme und der Klon B3 eine schwache Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit (Abbildung 21B). Man kann daher davon ausgehen, dass die

Migrationsgeschwindigkeit durch die stabile Expression von EGFP-Rac1b in den H23-Zellen nicht beeinflusst wurde.

Damit eine Zelle migrieren kann, werden an der richtungsweisenden Front Lamellipodien ausgebildet, die durch Rac1 induziert werden können [153]. Matos *et al.* zeigten in der Kolonkarzinom-Zelllinien SW480, dass Rac1b im Gegensatz zu Rac1 nicht in der Lage ist, Lamellipodien zu induzieren [33]. Diese Daten unterstützen die hier gemachte Beobachtung, dass die stabile Expression von EGFP-Rac1b in den H23-Klonen keine Lamellipodien induzierte (Abbildung 24C) und somit die Migration nicht beeinflusst.

Die unveränderte Migrationsgeschwindigkeit der stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Zellen im Vergleich zu den stabil EGFP-exprimierenden Kontrollzellen korreliert mit einem differenzierteren Phänotyp. Diese stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden Zellen wiesen keinen *Cadherin Switch* und somit keine EMT auf (siehe 7.1.2), die einen mesenchymalen Phänotyp der Zellen induzieren und die mit einer Zunahme der Migrationsfähigkeit der Zellen einher gehen könnte [154, 155].

Die stabile Expression von EGFP-Rac1 in H23-Zellen bewirkte dagegen eine Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit (Abbildung 21B). Dies steht im Widerspruch zu der in 7.1.2 gezeigten Rac1-abhängigen Induktion einer EMT in H23-Zellen, bei der die Zellen einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Dieser sollte mit einer gesteigerten Migrationsfähigkeit korrelieren [155]. Dieser beobachtete EMT-induzierende Effekt fiel jedoch eher mild aus und scheint keine Mechanismen zu aktivieren, die die Migrationsgeschwindigkeit der stabil EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Zellen steigern bzw. aufrechterhalten kann.

Bei der Migration handelt es sich um einen lokal streng regulierten Prozess. Die lokale Aktivierung von Rac1 zusammen mit Rac1-Effektorproteinen (z. B. WASP/WAVE-Familie und Arp2/3) induziert die Ausbildung von Lamellipodien an der richtungsweisenden Front. Am posterioren Ende dagegen ist Rac1 kaum aktiv [156]. In dem hier beschriebenen Modell, in dem EGFP-Rac1 in den H23-Klonen deutlich überexprimiert ist, wurde keine Ausbildung von Lamellipodien beobachtet (Abbildung 24C). Eine lokale Aktivierung dieser Rho-GTPase an der richtungsweisenden Front könnte daher aufgrund der Überexpression nicht mehr möglich sein, was die Ausbildung der Lamellipodien verhindern kann. Dies stellt eine mögliche Erklärung für den Widerspruch einer EMT-Induktion und einer reduzierten Migrationsgeschwindigkeit in den stabil EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klonen dar.

Der TGF $\beta$ -Signalweg bewirkt in vielen Tumorzellen eine Zunahme der Migrationsfähigkeit [157]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob dieser Effekt durch die stabile Expression der EGFP-Rac-Isoformen beeinflusst werden kann. In Wundheilungs-Assays konnte TGF $\beta$ 1 erwartungsgemäß einen generellen Anstieg der Migrationsgeschwindigkeit bewirken,

allerdings wurde dieser Effekt weder durch EGFP-Rac1b noch durch EGFP-Rac1 weiter beeinflusst (Abbildung 21B), sodass eine Beteiligung dieser Rho-GTPasen an der TGF $\beta$ -induzierten Migration in H23-Zellen unwahrscheinlich ist.

#### 7.1.4 EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 in der Genregulation

Die beiden Rho-GTPasen Rac1 und Rac1b sind an vielen Signalwegen beteiligt, die in einer Beeinflussung der Genregulation resultieren können (Abbildung 18A, Abbildung 22). Während ein Einfluss von Rac1 auf die Genexpression in einigen Fällen gezeigt werden konnte [158-160], ist die genregulatorische Funktion von Rac1b bisher kaum untersucht. In dieser Arbeit wurde daher der Effekt von konstitutiv-aktivem HA-Rac1b(G12V) auf die Aktivierung ausgewählter Promotoren in H23-Zellen untersucht und mit der Promotoraktivierung durch konstitutiv-aktives HA-Rac1(G12V) verglichen (Abbildung 18C). Eine Analyse von bekannten, Rac1-induzierbaren Promotorkonstrukten zeigte eine mindestens 4-fache Induktion der SRE.L-, TOPflash-, p3TP-lux-, E-Cadherin- und AP-1-Reporter durch die Expression von konstitutiv-aktivem HA-Rac1(G12V) in H23-Zellen (Abbildung 18C) [158-160]. Konstitutiv-aktives HA-Rac1b(G12V) war dagegen nicht in der Lage eines dieser Rac1-induzierbaren Reporterkonstrukte zu aktivieren (Abbildung 18C). Um eine Rac1b-spezifische Promotoraktivierung beispielhaft zu analysieren, wurden außerdem Reporterkonstrukte analysiert, für die nur eine geringe Aktivierung von konstitutiv-aktivem HA-Rac1(G12V) in H23-Zellen gezeigt werden konnte. Darunter fallen beispielsweise der XFN (Fibronektin)-, der Ets2- und der N-Cadherin-Reporter (Abbildung 18C). Diese wurden ebenfalls nicht durch konstitutiv-aktives HA-Rac1b(G12V) induziert (Abbildung 18C), sodass in dieser Arbeit keine genregulatorische Funktion von HA-Rac1b(G12V) in H23-Zellen nachgewiesen werden konnte.

Eine Besonderheit stellte das SRE.L-Promotorkonstrukt dar. Beim *serum response element* (SRE) handelt es sich um ein gut beschriebenes, artifizielles Promotorelement, das einen Teil des *c-fos*-Promotors enthält [65] und an das SRF allein oder zusammen mit TCF binden kann [65, 161]. Durch eine Mutation der TCF-Bindestelle, die eine Bindung von TCF verhindert, wurde in Genreporter-Assays mit dem SRE.L-Reporterkonstrukt der Einfluss von SRF unabhängig von der TCF-Bindung untersucht [162]. SRF kann durch die Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 reguliert werden. Durch die Induktion der Aktinpolymerisation wird der SRF-Koregulator MRTF von monomerem G-Aktin freigesetzt und kann zusammen mit SRF die Genexpression regulieren [163].

In H23-Zellen bewirkte transient exprimiertes, konstitutiv-aktives HA-Rac1b(G12V) keine Aktivierung des SRE.L-Reporterkonstrukts (Abbildung 18C). Dies korreliert mit der Beobachtung, dass EGFP-Rac1b in den H23-Zellen keine Lamellipodien ausbilden konnte (Abbildung 24C). Somit scheint Rac1b keine Aktinpolymerisation in diesen Zellen zu

induzieren, die eine Freisetzung von MRTF und so die Aktivierung von SRF bewirken könnte.

Die transiente Expression von konstitutiv-aktivem HA-Rac1(G12V) bewirkte dagegen eine 22-fache Aktivierung des SRE.L-Reporterkonstruktes (Abbildung 18C), wie es schon in MDCK und EpRas-Zellen gezeigt wurde [159].

In den stabil EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klonen wurde ein gegenteiliger Effekt der SRE.L-Promotoraktivierung beobachtet (Abbildung 20). Stabil exprimiertes EGFP-Rac1 bewirkte keine Induktion dieses Promotorkonstrukts (Abbildung 20). Unter diesen Versuchsbedingungen lag jedoch nur ein geringer Anteil der Gesamt-EGFP-Rac1-Proteinmenge im aktiven, GTP-gebundenen Zustand vor (Abbildung 19B). Unter physiologischen Bedingungen können zelluläre Regulationsmechanismen einer übermäßigen Rac1-Aktivierung entgegenwirken, indem beispielsweise Rho-GDIs im Zytosol an Rac1 binden und eine weitere Aktivierung dieser Rho-GTPase verhindern [22]. Ohne einen entsprechenden Stimulus liegt möglicherweise in diesem H23-Zellklon zu wenig aktives, GTP-gebundenes EGFP-Rac1 vor, um eine SRF-Aktivierung zu ermöglichen.

In den stabil EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klonen wurde dagegen eine signifikante Verdopplung der SRE.L-Promotoraktivität beobachtet (Abbildung 20). Die langanhaltende EGFP-Rac1b-Expression könnte in den H23-Zellen in merklichen Adaptationseffekten resultieren, wie sie hier für die SRE.L-Promotoraktivierung beobachtet wurden. Diese Beobachtung könnte die außerordentliche Fähigkeit der Zellen unterstreichen, sich an große Veränderungen ihrer Genexpression anzupassen, um das Überleben der Zellen zu gewährleisten.

Esufali *et al.* beschrieben für die Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 eine 7-fache Aktivierung des TOPflash-Reporters durch Rac1b und korrelierten die Rac1b-abhängige Promotoraktivierung mit der erhöhten Aktivität des Wnt-Signalweges [164]. Bei der H23-Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie mit einem autokrin aktivierten Wnt-Signalweg [165]. In dieser Arbeit wurde jedoch trotz aktiviertem Wnt-Signalweg keine Rac1b-induzierte Aktivierung des TOPflash-Reporters beobachtet (Abbildung 18C). Obwohl manche Publikationen eine Aktivierung verschiedener Promotoren durch Rac1b beschrieben [166, 167], konnte in dieser Arbeit keine genregulatorische Funktion von konstitutiv-aktivem HA-Rac1b(G12V) nachgewiesen werden. Somit kann es sich hierbei um einen weiteren Rac1b-spezifischen Effekt handeln, der sich von den Rac1-induzierten genregulatorischen Effekten unterscheidet.

### 7.1.5 Der Einfluss der 3-Dimensionalität auf EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-induzierte Zelldifferenzierung

Für Rac1 wurde eine gesteigerte Expression in Lungenkarzinomen beobachtet, die mit einer kürzeren Überlebenszeit korreliert [12]. In dieser Arbeit wurde durch die erhöhte EGFP-Rac1-Expression in der NSCLC-Zelllinie H23 eine gesteigerte Proliferation, eine Induktion der EMT und eine reduzierte Migration beobachtet, was hauptsächlich auf eine pro-tumorigene Funktion von Rac1 hindeutet. Obwohl bereits Studien in Ovarialkarzinomen mit dem Rac1- und Cdc42-Inhibitor Ketorolac verglichen mit der Placebo-Gruppe ein längeres Überleben bewirkte [168], werden durch weitere Forschungen möglicherweise in Zukunft spezifische Rac1-Inhibitoren zur Verfügung stehen, die auch in der Therapie von Lungentumoren eingesetzt werden können.

In der vorliegenden Arbeit bewirkte die Rho-GTPase Rac1b in der NSCLC-Zelllinie H23 weder eine Induktion der EMT noch eine gesteigerte Migration und zeigte außerdem keinen Einfluss auf die Regulation der Genexpression. Damit unterscheidet sich die Funktion von Rac1b von seiner Spleiß-Isoform Rac1 und könnte sogar als potenzieller Gegenspieler wirken, was allerdings in aufbauenden Arbeiten genauer analysiert werden müsste. Dies würde die Entwicklung Rac1-spezifischer Inhibitoren aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit erschweren, da in diesem Fall eine Inhibierung von Rac1b nicht wünschenswert wäre.

Dennoch bewirkte die stabile Expression von EGFP-Rac1b in den H23-Zellen nur sehr wenige Effekte verglichen mit den stabil EGFP-exprimierenden Kontrollzellen. Diese Ergebnisse wurden mittels der Standard-Kultivierungsmethode generiert, bei denen die Zellen 2-dimensional auf einer Plastikoberfläche kultiviert wurden. Die 2D-Kultivierung kann deutliche Veränderung in vielen zellulären Prozessen, wie beispielsweise der Proliferation, Genexpression und Signaltransduktion induzieren [112]. Um die Situation im Tumor besser nachstellen zu können, wurde das Modell der 3D-Kultivierung eingeführt, bei der die Zellen in einem 3D-Verband wachsen und je nach Kultivierungsmethode mit der umgebenden Matrix interagieren können [112].

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der 3-Dimensionalität auf die Induktion Rac1b-spezifischer Effekte bezüglich einer Induktion der EMT näher untersucht. Dafür wurden die stabil EGFP-Rac1b- und EGFP-Rac1-exprimierenden H23-Klone mittels magnetischer Levitation in 3D kultiviert und der Differenzierungsstatus mit den 2D-kultivierten H23-Klonen verglichen (Abbildung 28).

Durch die 3D-Kultivierung nahm die Proteinmenge des mesenchymalen Differenzierungsmarkers N-Cadherin ab. Dabei handelte es sich um einen 3D-abhängigen Effekt, der nicht weiter durch EGFP-Rac1 bzw. EGFP-Rac1b beeinflusst wurde (Abbildung 28).

Außerdem bewirkte die 3D-Kultivierung eine Reduktion der Vimentin-Proteinmenge in den stabil EGFP-Rac-exprimierenden H23-Klonen. Während EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b in den 2D-kultivierten H23-Zellen keinen Einfluss auf die Vimentinmenge ausübten, bewirkten die beiden EGFP-Rac-Isoformen in den 3D-kultivierten Zellen eine weitere Abnahme der Vimentin-Proteinmenge (Abbildung 28).

Die reduzierten Proteinmengen von N-Cadherin und Vimentin deuten darauf hin, dass durch die 3D-Kultivierung der stabil EGFP-Rac1- und EGFP-Rac1b-exprimierenden H23-Klonen eine epitheliale Differenzierung stattgefunden haben könnte. Die verstärkte Reduktion der Vimentin-Menge durch EGFP-Rac1 und EGFP-Rac1b deuten darauf hin, dass durch die 3D-Kultivierung eine Veränderung der Signaltransduktion stattgefunden haben könnte, sodass EGFP-Rac1b und EGFP-Rac1 die Vimentin-Menge beeinflussen können, wie es in 2D-kultivierten Zellen nicht möglich war. Die 3D-Kultivierung kann eine bessere Annäherung an humane Tumore darstellen und daher einige Prozesse im Tumor besser modellieren als die 2D-Kultivierung. So können weitere Rac1- bzw. Rac1b-abhängige Prozesse sowie deren Auswirkungen auf Lungentumorzellen identifiziert werden. Durch eine Steigerung der Komplexität des 3D-Kultivierungsmodells durch das Einbetten der Zellen in eine Hydrogelmatrix oder die Ko-Kultivierung mit weiteren Zelltypen kann die Annäherung des 3D-Kultivierungsmodells an die Bedingungen in humanen Lungentumoren weiter verbessert werden.

## 7.2 3D-Kultivierungsmethoden

In humanen Lungentumoren interagieren die Tumorzellen stark mit ihrer Mikroumgebung, was einen großen Einfluss auf die zellulären Vorgänge in den Tumorzellen haben kann. Darunter fallen veränderte Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakte, aber auch direkte und indirekte Interaktionen mit weiteren Zelltypen (z. B. Fibroblasten und Makrophagen) [169, 170].

Um dieses Zusammenspiel zwischen den Tumorzellen und der Mikroumgebung besser modellieren und verstehen zu können, wurde die 3D-Zellkultivierung entwickelt [117]. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene 3D-Kultivierungsmethoden mit den NSCLC-Zelllinien H358 und H23 etabliert und untereinander sowie mit der Standard-2D-Kultivierung verglichen.

Bei der magnetischen Levitation bildeten die Zellen in einem magnetischen Feld durch Zell/Zell-Kontakte einen 3-dimensionalen Zellverband aus. In diesem Modell kann der Einfluss der 3-Dimensionalität auf das Zellverhalten analysiert werden ohne einen Einfluss einer EZM oder weiterer Zellarten berücksichtigen zu müssen. Durch die Größe des Zellverbandes, der mit dieser Kultivierungsmethode generiert wurde, könnte sich ein innerer, nekrotischer Kern ausgebildet haben, da nicht genügend Sauerstoff und Nährstoffe zu den zentralen Zellen diffundieren können und sich CO<sub>2</sub> und Abfallstoffe akkumulieren.

Um die Komplexität des Modells weiter zu steigern, wurden die NSCLC-Zellen in eine Hydrogelmatrix eingebettet. Nach einer Kultivierung von 3 Tagen bildeten die Zellen 3-dimensionale Strukturen aus, die die *in vivo* Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakte modellieren können. Die ausgebildeten Strukturen wiesen jedoch einen relativ kleinen Durchmesser auf, weswegen man davon ausgehen kann, dass kein nekrotischer Kern nachweisbar ist. Da die Zusammensetzung der EZM eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung und -progression spielt, wurden zwei verschiedene Hydrogele verwendet. Matrigel besteht hauptsächlich aus Laminin und Kollagen IV, die die Hauptbestandteile der Basalmembran darstellen. Kollagen I ist das am häufigsten vorkommende Kollagen der EZM und kann laut Shintani *et al.* eine EMT in NSCLC-Zellen induzieren [171].

Um die Zellen besser beobachten und manipulieren zu können, wurden die Zellen mittels der modifizierten „3D on-top“-Kultivierung auf einer dünnen Hydrogelschicht (Matrigel oder Kollagen I) ausgesät. Dort bildeten die Zellen ebenfalls 3-dimensionale Strukturen aus, die verglichen mit der 3D-Hydrogel-Kultivierung in einer planaren Ebene wuchsen. Die Zellen wurden während dieser Kultivierung einerseits durch die darunterliegende Matrix beeinflusst, die die Ausbildung der 3D-Strukturen induzieren kann und andererseits hatten sie direkten Zugang zu Sauerstoff und Nährstoffen.

Unabhängig von der 3D-Kultivierungsmethode bildeten sich in den H358- und H23-Zellen unterschiedliche 3D-Strukturen aus. Die H358-Zellen, die unter 2D-Kultivierungsbedingungen einen epithelial differenzierten Phänotyp aufwiesen, bildeten runde, kompakte Sphäroide aus, die sich deutlich von der Umgebung abgrenzten. Die unter 2D-Kultivierungsbedingungen undifferenzierten H23-Zellen bildeten dagegen eine lockere 3D-Struktur mit einem verzweigten Netzwerk aus (Abbildung 29A, Abbildung 30, Abbildung 37A). Durch die 3D-Kultivierung weiterer NSCLC-Zelllinien (Daten nicht gezeigt) kann eine Korrelation zwischen dem 2D-Differenzierungsstatus der Zellen und der ausgebildeten 3D-Struktur hergestellt werden, die jedoch weiter untersucht werden muss.

### **7.2.1 Die 3D-Kultivierung kann eine epitheliale Differenzierung der Zellen induzieren**

In vielen Publikationen wurde eine De-Differenzierung der Zellen durch die 2D-Kultivierung beobachtet, die durch die 3D-Kultivierung wieder rückgängig gemacht werden konnte [114, 172, 173]. In dieser Arbeit wurden epitheliale und mesenchymale Differenzierungsmarker nachgewiesen, die eine Analyse des Differenzierungsstatus der 3D-kultivierten NSCLC-Zellen ermöglichte.

Durch die 3D-Kultivierung der H358- und H23-Zellen in einer Kollagen I-Matrix war der Nachweis vieler Proteine entweder überhaupt nicht oder nur in sehr geringen Mengen möglich (Abbildung 31A), obwohl die Ponceau-Färbung eine vergleichbare

Proteinkonzentration und -verteilung aufwies wie 2D-kultivierte Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine beispielhafte Überprüfung der Proteinkonzentration nach dem Kollagenaseverdau von 2D-kultivierten Zellen spricht gegen einen proteolytischen Abbau der Proteine (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde eine transkriptionelle Hemmung durch die Kollagen I-Kultivierung durch die Analyse beispielhafter mRNAs mittels qRT-PCR überprüft (Abbildung 31B, C). Obwohl die *CTNNB1*-mRNA (kodierend für  $\beta$ -Catenin) in den H23-Zellen um 50 % reduziert vorlag, kann eine Hemmung der Transkription nicht den kompletten  $\beta$ -Catenin-Proteinverlust erklären. Da ein Großteil der Proteine überhaupt nicht oder nur deutlich reduziert nachgewiesen werden konnte, ist diese 3D-Kultivierungsmethode nicht geeignet um die Situation in humanen Lungentumoren zu analysieren. Die Charakterisierung des Kollagen I-Zellkultur-Modells wurde daher in dieser Arbeit nur teilweise weiterverfolgt.

Die 3D-Kultivierung mittels magnetischer Levitation und in einer Matrigelmatrix ermöglichten einen zuverlässigen Proteinnachweis, sodass durch die Analyse von Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakten Rückschlüsse auf den Differenzierungsstatus der 3D-kultivierten H358- und H23-Zellen gezogen werden können.

Die H358-Zellen zeigten in der 3D-Kultivierung mittels magnetischer Levitation eine Zunahme der E-Cadherin-Proteinmenge, während durch die 3D-Kultivierung in und auf einer Matrigelmatrix die mesenchymalen Markerprotein N-Cadherin und Vimentin reduziert vorlagen (Abbildung 29B, Abbildung 31A, Abbildung 38A). H23-Zellen, die mittels magnetischer Levitation kultiviert wurden, wiesen reduzierte N-Cadherin- und Vimentin-Konzentrationen auf, während die Matrigel-Kultivierung eine Zunahme von E-Cadherin und eine Abnahme von Vimentin bewirkte (Abbildung 29B, Abbildung 31A, Abbildung 38A). Eine Herunterregulation von mesenchymalen Markerproteinen, wie N-Cadherin und Vimentin sowie die Hochregulation des epithelialen Differenzierungsmarkers E-Cadherin zeigen, dass durch die 3D-Kultivierung der H358- und H23-Zellen eine epitheliale Differenzierung stattfand.

Die Induktion einer epitheliale Differenzierung wird weiter durch die Herunterregulation des EMT-induzierenden Transkriptionsfaktors ZEB2 in 3D-Matrigel-kultivierten H358- und H23-Zellen unterstützt. Bei ZEB2 handelt es sich um einen transkriptionellen Repressor von *CDH1* (kodierend für E-Cadherin) und weiterer Gene, die einen epithelialen Phänotyp bewirken können [174]. Eine aktivierende transkriptionelle Aktivität von ZEB2 wurde bisher nicht nachgewiesen, jedoch korrelierte ZEB2 mit einer erhöhten Expression der mesenchymalen Markerproteine N-Cadherin und Vimentin [175, 176], die indirekt durch ZEB2 aktiviert werden könnten.

Ein Vergleich der ZEB2-Expression in NSCLC-Patienten zeigte eine deutlich höhere ZEB2-Proteinmenge in Tumorgewebe verglichen mit dem korrespondierenden Normalgewebe, was

auf eine relevante Funktion von ZEB2 in der Entstehung und Entwicklung von NSCLC-Tumoren hindeutet [177].

Neben der Isolation von Proteinen ist auch die Isolation von RNA aus 3D-kultivierten H358- und H23-Zellen möglich, mit der Genexpressionsanalysen durchgeführt werden können. In dieser Arbeit wurde mithilfe von PCR Arrays die Expression von EZM- und Adhäsionsproteinen in 3D- mit 2D-kultivierten Zellen verglichen (Abbildung 34, Abbildung 35, Abbildung 36). Im Folgenden werden beispielhaft interessante Gene näher beschrieben, die in 2D- und 3D-kultivierten Zellen unterschiedlich reguliert wurden.

In H358- und H23-Zellen bewirkte die 3D-Kultivierung in einer Matrigelmatrix eine erhöhte Expression von *COL6A1* (Abbildung 35B, Abbildung 36B), das für eine der drei Ketten des Kollagen VI-Moleküls kodiert. Es handelt sich dabei um ein perlenschurartiges Kollagen, das mit der Basalmembran assoziiert ist und dort die epithelialen Lungenzellen mit den Komponenten der Basalmembran verbindet und die Elastizität des Lungengewebes gewährleistet [178, 179].

Die erhöhte *COL6A1*-Expression der 3D-Matrigel-kultivierten H358- und H23-Zellen kann demnach auf eine verstärkte Adhäsion der Zellen an die umgebende EZM hindeuten, was einen epithelial differenzierteren Phänotyp der Zellen widerspiegeln kann.

Eine Fehlregulierung in der Zusammensetzung und der Steifheit der EZM kann die Entstehung von Fibrose oder invasiven Lungentumoren begünstigen [180].

Die Zusammensetzung der EZM untersteht einem ständigen, kontrolliertem Auf- und Abbau um die Homöostase des Lungengewebes zu gewährleisten. An der Degradation ist hauptsächlich die Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) beteiligt, deren Mitglieder unterschiedliche EZM-Komponenten degradieren können [180, 181]. Die 3D-Kultivierung von H358-Zellen bewirkte eine verstärkte Expression von MMP13, die die Degradation von Kollagen I und Bestandteilen der Basalmembran bzw. der Matrigelmatrix (Kollagen IV, Aggrecan, Perlecan) bewirken kann [182]. Für MMP13 wurde sowohl eine Sekretion durch epitheliale Tumorzellen als auch durch Fibroblasten beschrieben [183, 184], was die Unterschiede der MMP13-Expression in den beiden NSCLC-Zelllinien erklären kann.

Beide hier aufgeführten Gene (*COL6A1* und *MMP13*) sind in den jeweiligen Zelllinien ebenfalls durch die 3D-Kultivierung in einer Kollagen I-Matrix erhöht (Abbildung 35B, C und Abbildung 36B, C) und deuten auf eine epitheliale Differenzierung der Zellen unter diesen Kultivierungsbedingungen hin.

Ziel dieser Arbeit war eine vergleichende Analyse von 3D-Kultivierungsmethoden für die NSCLC-Zelllinien H358 und H23. Dabei sollte eine Kultivierungsmethode identifiziert werden, die die Situation in humanen Lungentumoren am besten nachstellen kann.

Aufgrund der hier generierten Daten handelt es sich dabei um die 3D-Kultivierung in einer

Matrigelmatrix. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die H358- und die H23-Zellen unter diesen Kultivierungsbedingungen 3D-Strukturen ausbildeten, die in direktem Kontakt mit einer EZM stehen. Die Hochregulation der epithelialen und die Herunterregulation der mesenchymalen Markerproteine deuten auf eine epitheliale Differenzierung der Zellen hin, die durch die Ausbildung von Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakten induziert werden könnte. Auf RNA-Ebene wies die Hochregulation von *COL6A1* und *MMP13* auf eine verbesserte Modellierung des *in vivo*-Verhaltens der Zellen hin, indem die Zelladhäsion und der Umbau der umgebenden Matrix gefördert werden könnte. Ein Nachteil dieser Kultivierungsmethode ist jedoch der hohe Kostenpunkt und die lange Kultivierungsdauer.

Die Kosten könnten durch die Verwendung der modifizierten „3D on-top“-Kultivierung auf einer dünnen Matrigelschicht deutlich reduziert werden, da geringere Matrigelmengen verwendet werden. Außerdem wurde auf Proteinebene ein vergleichbarer Effekt auf die epitheliale Differenzierung gezeigt, wie für die Zellen innerhalb einer 3D-Matrigelmatrix. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht vollständig charakterisiert und es liegen hierfür keine Genexpressionsdaten vor.

### 7.2.2 Änderung in der Kinase-Aktivität durch die 3D-Kultivierung

In dieser Arbeit wurde außerdem untersucht, ob die 3D-Kultivierung der Zellen weitere zellulärer Prozesse beeinflussen kann. Eine Analyse zentraler Komponenten der Signaltransduktion zeigte teilweise deutliche Unterschiede zwischen den 2D- und 3D-kultivierten Zellen, darunter fielen unter anderem die ERK1/2-, die p38- und die Akt-Aktivität. Die Aktivität von ERK1/2 lag durch jede der drei 3D-Kultivierungsarten (magnetische Levitation, 3D-Matrigelmatrix und modifizierte „3D on-top“-Kultivierung auf einer Matrigelschicht) reduziert vor (Abbildung 29C, Abbildung 33, Abbildung 38B).

ERK1/2 ist ein zentraler Regulator der Proliferation, der über die Transkription von *immediate early*-Genen eine G<sub>1</sub>/S-Transition der Zellen bewirken kann [39, 42]. Die verringerte ERK1/2-Aktivität in den 3D-kultivierten NSCLC-Zellen deutet auf einen möglichen anti-proliferativen Effekt hin. Dies wird weiterhin in NSCLC-Zellen unterstützt, die in oder auf einer Matrigelmatrix kultiviert wurden und bei denen neben der ERK1/2-Aktivität auch die Aktivität von Akt reduziert vorliegt (Abbildung 33, Abbildung 38B). Akt ist ebenfalls an der Regulation der Proliferation beteiligt und eine reduzierte Akt-Aktivität korreliert mit einer verringerten Proliferationsrate [145]. Die 3D-Kultivierung der NSCLC-Zelllinien H358 und H23 können demnach durch eine reduzierte ERK1/2- und Akt-Aktivität eine reduzierte Proliferationsgeschwindigkeit bewirken, wie es schon für die Kolonkarzinom-Zelllinien LS174T, HT29, HCT116 und DLD-1 gezeigt werden konnte [185]. Da die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen innerhalb einer 3D-Matrix aufgrund der erschwerten Zugänglichkeit der Zellen nur schwer bestimmt werden kann, wurde in dieser Arbeit der Anteil an proliferierenden, Ki67<sup>+</sup> H358- und H23-Zellen bestimmt, die mithilfe der

modifizierten „3D on-top“-Kultivierung auf einer dünnen Matrigelschicht kultiviert wurden. Dabei wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den 2D- und 3D-kultivierten Zellen nachgewiesen (Abbildung 37C), die jedoch aufgrund der großen Unterschiede zwischen den Messungen überlagert worden sein könnten.

In dieser Arbeit wurde zudem die Aktivität von p38 untersucht. Hierfür zeigten die H358-Zellen, die in und auf einer Matrigelmatrix in 3D kultiviert wurden, eine erhöhte Aktivität und H23-Zellen, die unter denselben Bedingungen kultiviert wurden, eine reduzierte p38-Aktivität verglichen mit den 2D-kultivierten Zellen (Abbildung 33, Abbildung 38B). Diese beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien lassen keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Funktion der p38-Aktivität in 3D-kultivierten NSCLC-Zelllinien zu. p38 ist an der Regulation vieler zellulärer Prozesse beteiligt, darunter fallen Migration, Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Entzündungsprozesse [186]. Daher wurde das Migrationsverhalten von H358- und H23-Zellen bestimmt, die mittels „3D on-top“-Kultivierung auf einer dünnen Matrigelmatrix kultiviert wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die einzelnen, ausgebildeten H358-Zellsphäroide als Einheit um ihren Platz herum migrieren, während bei den H23-Zellen nur einzelne Zellen migrierten, um weitere Zellverbindungen auszubilden (Abbildung 37B). Diese Beobachtung korreliert mit der Aktivität von p38: Die 3D-kultivierten H358-Zellen, die einen großen Anteil migrierender Zellen aufweist, hat eine erhöhte p38-Aktivität verglichen mit den 2D-kultivierten H358-Zellen. Die 3D-kultivierten H23-Zellen dagegen wiesen nur einen geringen Anteil an migrierenden Zellen auf, die mit einer reduzierten p38-Aktivität korrelierte. In weiterführenden Arbeiten sollte dieser Zusammenhang und die Funktion von p38 in diesen NSCLC-Zelllinien näher untersucht werden.

Eine Analyse der Proteinkinase-Aktivität in den 3D-kultivierten NSCLC-Zelllinien zeigte eine große Ähnlichkeit zwischen der 3D-Matrigel-Kultivierung und der modifizierten „3D on-top“-Kultivierung auf einer dünnen Matrigelschicht. Daher eignet sich für Analysen der Proteinkinase-Aktivität insbesondere die modifizierte „3D on-top“-Kultivierung, da sie sowohl den Einfluss des 3-dimensionalen Wachstums als auch den Einfluss einer EZM berücksichtigt. Es handelt sich dabei um eine Methode, bei der die Zellen an ihrer basalen Seite von der Matrigelmatrix beeinflusst werden und auf ihrer apikalen Seite direkten Zugang zum Zellkulturmedium haben. Auf diese Weise ist eine Manipulation der Zellen durch Wachstumsfaktoren, Aktivatoren bzw. Inhibitoren leicht möglich. Außerdem wachsen die Zellen in einer planaren Ebene, sodass die Zellen in einer Fokusebene leicht mit dem Mikroskop beobachtet werden können. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist der geringe Matrigelverbrauch, der den Kostenfaktor deutlich reduziert verglichen mit der 3D-Matrigel-Kultivierung. Jedoch werden die Zellen bei dieser 3D-Kultivierungsmethode nur für etwa

3 Tage auf der Matrigelmatrix kultiviert, sodass Langzeiteffekte auf die Signaltransduktion hierbei nicht analysiert wurden.

### **7.2.3 Ausblick: Einsatz der 3D-Zellkultivierung in der Medikamenten-Entwicklung**

Um die Funktionen und Bedingungen von humanen Tumoren besser modellieren zu können, wurde die 3D-Zellkultur entwickelt. Dieses System kann durch das Einbetten in einer Hydrogelmatrix oder durch die Ko-Kultivierung mit weiteren Zelltypen weiter an *in vivo*-Bedingungen angepasst werden [111, 187].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die 3D-Kultivierung eine epitheliale Differenzierung sowie Änderungen der Genexpression und der Proteinkinase-Aktivität induziert werden können, die die Bedingungen in humanen Tumoren besser widerspiegeln als die 2D-Kultivierung [188].

Diese Zellkultivierungs-Modelle können in Zukunft eingesetzt werden, um einerseits das Verhalten eines Tumors besser zu verstehen und andererseits um die Behandlung von Tumoren verbessern zu können [111]. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein entwickelter Wirkstoff nach der Durchführung klinischer Studien von der zuständigen Behörde zugelassen wird, beträgt momentan ca. 10 % [189]. Durch die 3D-Kultivierung könnte die Wirksamkeit und Toxizität vieler Wirkstoffe schon in frühen Stadien, also vor der Prüfung im Tiermodell bzw. vor der Durchführung klinischer Studien, besser vorhergesagt und die Kosten für die Medikamenten-Entwicklung gesenkt werden [111, 187].

Die 3D-Kultivierung in einer Matrigelmatrix stellt für NSCLC-Zelllinien ein solches Kultivierungsmodell dar, mit der die Wirksamkeit und Toxizität von neuen Wirkstoffen analysiert werden kann.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

2D	2-dimensional
3D	3-dimensional
$\alpha$	Signifikanzniveau
A	Extinktion
ACTR	<i>actin-related protein</i>
ALK	anaplastische Lymphomkinase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
b	Pfadlänge
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C (Aminosäure)	Cystein
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdc42	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CMF-PBS	<i>calcium and magnesium free phosphate buffered saline</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRIB	<i>Cdc42/Rac1 interactive binding</i>
DAPI	4,6-Diamindin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
e	Wellenlängen-abhängiger Extinktionskoeffizient

EC-Domäne	extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FAT	<i>focal adhesion targeting</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FERM-Domäne	<i>protein 4.1, ezrin, radixin and moesin homology</i> -Domäne
G (Aminosäure)	Glyzin
G	Gauge
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDI	Guanin-Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPPNP	5'-Guanylyl-imidodiphosphat
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
I-Domäne	<i>inserted</i> -Domäne
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
ILF	Interstitielle Lungenfibroblasten

JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
kb	Kilobase
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Kol	Kollagen
K-Ras	<i>Kristen rat sarcoma</i>
$\lambda$	Verdopplungskonstante
L (Aminosäure)	Leucin
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LIMK	<i>LIM domain kinase</i>
LN	Laminin
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MadCAM	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
MAPK(s)	<i>mitogen-activated protein kinase(s)</i>
MAPKK(s)	<i>mitogen-activated protein kinase kinase(s)</i>
MAPKKK(s)	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase(s)</i>
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MIDAS	<i>metal-ion-dependent adhesive site</i>
min	Minute
mk	monoklonal
ml	Milliliter

MLK	<i>mixed lineage kinase</i>
MRTF	<i>myocardin-related transcription factor</i>
mTORC	<i>mammalian target of rapamycin complex</i>
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NLK	<i>Nemo-like kinase</i>
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Signifikanzwert
P-	Phospho-
PAK	<i>p21-activated kinase</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDK	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(3,4)-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat
pk	polyklonal
poly-HEMA	poly-2-Hydroxyethyl-methacrylat
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin
PTP-PEST	<i>protein tyrosine phosphatase-PEST</i>
Q (Aminosäure)	Glutamin
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RBD	Rac-Bindedomäne
RGD (Aminosäuren)	Arginin-Glyzin-Aspartat
Rho	<i>Ras homologous</i>
RLU	relative Lichteinheit
rpm	<i>rounds per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
S (Aminosäure)	Serin
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom
SD	Standardabweichung

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
SH2/3	<i>Src-homology 2/3</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	sogenannten
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
T (Aminosäure)	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>tumor necrosis factor-Rezeptor</i>
TNM-Status	Tumor, Nodus, Metastasen-Status
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
U	<i>unit</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V (Aminosäure)	Valin
V	Volt
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLA	<i>very late antigen</i>
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WAVE	<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
Y (Aminosäure)	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel
ZEB	<i>zinc finger E-box-binding homeobox</i>

## 9 Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut: **Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016**. In.: Robert Koch-Institut; 2016.
2. Jackman DM, Johnson BE: **Small-cell lung cancer**. *Lancet* 2005, **366**(9494):1385-1396.
3. Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL: **Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications**. *Lung Cancer* 2013, **82**(2):179-189.
4. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM: **Lung cancer**. *N Engl J Med* 2008, **359**(13):1367-1380.
5. Lee HY, Lee SH, Won JK, Lee DS, Kwon NJ, Choi SM, Lee J, Lee CH, Lee SM, Yim JJ *et al*: **Analysis of Fifty Hotspot Mutations of Lung Squamous Cell Carcinoma in Never-smokers**. *J Korean Med Sci* 2017, **32**(3):415-420.
6. Zhang Y, Zheng D, Li Y, Pan Y, Sun Y, Chen H: **Comprehensive investigation of clinicopathologic features, oncogenic driver mutations and immunohistochemical markers in peripheral lung squamous cell carcinoma**. *J Thorac Dis* 2017, **9**(11):4434-4440.
7. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE *et al*: **International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma**. *J Thorac Oncol* 2011, **6**(2):244-285.
8. Pham D, Kris MG, Riely GJ, Sarkaria IS, McDonough T, Chuai S, Venkatraman ES, Miller VA, Ladanyi M, Pao W *et al*: **Use of cigarette-smoking history to estimate the likelihood of mutations in epidermal growth factor receptor gene exons 19 and 21 in lung adenocarcinomas**. *J Clin Oncol* 2006, **24**(11):1700-1704.
9. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N *et al*: **Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers**. *J Natl Cancer Inst* 2005, **97**(5):339-346.
10. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, Brzostowski EB, Riely GJ, Kris MG, Zakowski MF *et al*: **Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers**. *Clin Cancer Res* 2012, **18**(22):6169-6177.
11. Liu J, Lee W, Jiang Z, Chen Z, Jhunjhunwala S, Haverly PM, Gnad F, Guan Y, Gilbert HN, Stinson J *et al*: **Genome and transcriptome sequencing of lung cancers reveal diverse mutational and splicing events**. *Genome Res* 2012, **22**(12):2315-2327.
12. Zhou Y, Liao Q, Han Y, Chen J, Liu Z, Ling H, Zhang J, Yang W, Oyang L, Xia L *et al*: **Rac1 overexpression is correlated with epithelial mesenchymal transition and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer**. *J Cancer* 2016, **7**(14):2100-2109.
13. Yuan K, Qian C, Zheng R: **Prognostic significance of immunohistochemical Rac1 expression in survival in early operable non-small cell lung cancer**. *Med Sci Monit* 2009, **15**(11):BR313-319.
14. Zhou C, Licciulli S, Avila JL, Cho M, Troutman S, Jiang P, Kossenkov AV, Showe LC, Liu Q, Vachani A *et al*: **The Rac1 splice form Rac1b promotes K-ras-induced lung tumorigenesis**. *Oncogene* 2013, **32**(7):903-909.
15. Stallings-Mann ML, Waldmann J, Zhang Y, Miller E, Gauthier ML, Visscher DW, Downey GP, Radisky ES, Fields AP, Radisky DC: **Matrix metalloproteinase induction of Rac1b, a key effector of lung cancer progression**. *Sci Transl Med* 2012, **4**(142):142ra195.
16. Mehner C, Miller E, Nassar A, Bamlet WR, Radisky ES, Radisky DC: **Tumor cell expression of MMP3 as a prognostic factor for poor survival in pancreatic, pulmonary, and mammary carcinoma**. *Genes Cancer* 2015, **6**(11-12):480-489.
17. Heasman SJ, Ridley AJ: **Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**(9):690-701.
18. Aspenström P, Fransson A, Saras J: **Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system**. *Biochem J* 2004, **377**(Pt 2):327-337.
19. Spiering D, Hodgson L: **Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility**. *Cell Adh Migr* 2011, **5**(2):170-180.
20. Jaffe AB, Hall A: **Rho GTPases: biochemistry and biology**. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, **21**:247-269.

21. Grizot S, Fauré J, Fieschi F, Vignais PV, Dagher MC, Pebay-Peyroula E: **Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation.** *Biochemistry* 2001, **40**(34):10007-10013.
22. Scheffzek K, Stephan I, Jensen ON, Illenberger D, Gierschik P: **The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI.** *Nat Struct Biol* 2000, **7**(2):122-126.
23. Rathinam R, Berrier A, Alahari SK: **Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression.** *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011, **16**:2561-2571.
24. Sugihara K, Nakatsuji N, Nakamura K, Nakao K, Hashimoto R, Otani H, Sakagami H, Kondo H, Nozawa S, Aiba A *et al*: **Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation.** *Oncogene* 1998, **17**(26):3427-3433.
25. Heid I, Lubeseder-Martellato C, Sipos B, Mazur PK, Lesina M, Schmid RM, Siveke JT: **Early requirement of Rac1 in a mouse model of pancreatic cancer.** *Gastroenterology* 2011, **141**(2):719-730, 730.e711-717.
26. Kissil JL, Walmsley MJ, Hanlon L, Haigis KM, Bender Kim CF, Sweet-Cordero A, Eckman MS, Tuveson DA, Capobianco AJ, Tybulewicz VL *et al*: **Requirement for Rac1 in a K-ras induced lung cancer in the mouse.** *Cancer Res* 2007, **67**(17):8089-8094.
27. Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, Harbeck N, Schmitt M, Lengyel E: **Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b.** *Oncogene* 2000, **19**(26):3013-3020.
28. Liu SY, Yen CY, Yang SC, Chiang WF, Chang KW: **Overexpression of Rac-1 small GTPase binding protein in oral squamous cell carcinoma.** *J Oral Maxillofac Surg* 2004, **62**(6):702-707.
29. Pan Y, Bi F, Liu N, Xue Y, Yao X, Zheng Y, Fan D: **Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **315**(3):686-691.
30. Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K, Asami H, Ito Y, Yoshida K: **Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(14):4799-4805.
31. Biou V, Cherfils J: **Structural principles for the multispecificity of small GTP-binding proteins.** *Biochemistry* 2004, **43**(22):6833-6840.
32. Orlichenko L, Geyer R, Yanagisawa M, Khauv D, Radisky ES, Anastasiadis PZ, Radisky DC: **The 19-amino acid insertion in the tumor-associated splice isoform Rac1b confers specific binding to p120 catenin.** *J Biol Chem* 2010, **285**(25):19153-19161.
33. Matos P, Collard JG, Jordan P: **Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling.** *J Biol Chem* 2003, **278**(50):50442-50448.
34. Fiegen D, Haeusler LC, Blumenstein L, Herbrand U, Dvorsky R, Vetter IR, Ahmadian MR: **Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase.** *J Biol Chem* 2004, **279**(6):4743-4749.
35. Lei M, Lu W, Meng W, Parrini MC, Eck MJ, Mayer BJ, Harrison SC: **Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch.** *Cell* 2000, **102**(3):387-397.
36. Zenke FT, King CC, Bohl BP, Bokoch GM: **Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity.** *J Biol Chem* 1999, **274**(46):32565-32573.
37. Parrini MC, Camonis J, Matsuda M, de Gunzburg J: **Dissecting activation of the PAK1 kinase at protrusions in living cells.** *J Biol Chem* 2009, **284**(36):24133-24143.
38. Frost JA, Xu S, Hutchison MR, Marcus S, Cobb MH: **Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**(7):3707-3713.
39. Cargnello M, Roux PP: **Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2011, **75**(1):50-83.
40. Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE: **ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation.** *EMBO J* 1995, **14**(5):951-962.
41. Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J: **Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(8):556-564.
42. Shaulian E, Karin M: **AP-1 in cell proliferation and survival.** *Oncogene* 2001, **20**(19):2390-2400.
43. Johnson GL, Nakamura K: **The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1773**(8):1341-1348.

44. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ: **Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway.** *Science* 2000, **288**(5467):870-874.
45. Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS: **The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway.** *Cell* 1995, **81**(7):1137-1146.
46. Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M: **Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs.** *Cell* 1995, **81**(7):1147-1157.
47. Teramoto H, Coso OA, Miyata H, Igishi T, Miki T, Gutkind JS: **Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family.** *J Biol Chem* 1996, **271**(44):27225-27228.
48. Cuadrado A, Nebreda AR: **Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling.** *Biochem J* 2010, **429**(3):403-417.
49. Enslin H, Raingeaud J, Davis RJ: **Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6.** *J Biol Chem* 1998, **273**(3):1741-1748.
50. Baldassare JJ, Bi Y, Bellone CJ: **The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription.** *J Immunol* 1999, **162**(9):5367-5373.
51. Campbell J, Ciesielski CJ, Hunt AE, Horwood NJ, Beech JT, Hayes LA, Denys A, Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM: **A novel mechanism for TNF-alpha regulation by p38 MAPK: involvement of NF-kappa B with implications for therapy in rheumatoid arthritis.** *J Immunol* 2004, **173**(11):6928-6937.
52. Bates S, Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH: **Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression.** *Oncogene* 1998, **17**(13):1691-1703.
53. Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV: **Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K.** *Nature* 1997, **390**(6660):632-636.
54. Murga C, Zohar M, Teramoto H, Gutkind JS: **Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB.** *Oncogene* 2002, **21**(2):207-216.
55. Toliás KF, Cantley LC, Carpenter CL: **Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases.** *J Biol Chem* 1995, **270**(30):17656-17659.
56. Hemmings BA, Restuccia DF: **PI3K-PKB/Akt pathway.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012, **4**(9):a011189.
57. Singh A, Karnoub AE, Palmby TR, Lengyel E, Sondek J, Der CJ: **Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation.** *Oncogene* 2004, **23**(58):9369-9380.
58. Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B: **Ets ternary complex transcription factors.** *Gene* 2004, **324**:1-14.
59. Knöll B: **Serum response factor mediated gene activity in physiological and pathological processes of neuronal motility.** *Front Mol Neurosci* 2011, **4**:49.
60. Miano JM, Long X, Fujiwara K: **Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, **292**(1):C70-81.
61. Kuwahara K, Barrientos T, Pipes GC, Li S, Olson EN: **Muscle-specific signaling mechanism that links actin dynamics to serum response factor.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**(8):3173-3181.
62. Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R: **Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL.** *Cell* 2003, **113**(3):329-342.
63. Liu HW, Halayko AJ, Fernandes DJ, Harmon GS, McCauley JA, Kocieniewski P, McConville J, Fu Y, Forsythe SM, Kogut P *et al*: **The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, **29**(1):39-47.
64. Miki H, Yamaguchi H, Suetsugu S, Takenawa T: **IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling.** *Nature* 2000, **408**(6813):732-735.
65. Hill CS, Wynne J, Treisman R: **The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF.** *Cell* 1995, **81**(7):1159-1170.
66. Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, Abell A, Johnson GL, Hahn KM, Danuser G: **Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion.** *Nature* 2009, **461**(7260):99-103.

67. Kalluri R, Weinberg RA: **The basics of epithelial-mesenchymal transition.** *J Clin Invest* 2009, **119**(6):1420-1428.
68. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA: **Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease.** *J Clin Invest* 2009, **119**(6):1438-1449.
69. Martin TA: **The role of tight junctions in cancer metastasis.** *Semin Cell Dev Biol* 2014, **36**:224-231.
70. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL: **Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010, **15**(2):117-134.
71. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K: **Cadherin switch in tumor progression.** *Ann N Y Acad Sci* 2004, **1014**:155-163.
72. Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA: **A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(23):7003-7011.
73. Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL: **Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression.** *Mol Biol Cell* 2011, **22**(24):4750-4764.
74. Chalut KJ, Paluch EK: **The Actin Cortex: A Bridge between Cell Shape and Function.** *Dev Cell* 2016, **38**(6):571-573.
75. Sun BO, Fang Y, Li Z, Chen Z, Xiang J: **Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression.** *Biomed Rep* 2015, **3**(5):603-610.
76. Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D: **Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?** *Cancer Res* 2005, **65**(14):5991-5995; discussion 5995.
77. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J: **Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors.** *Nat Cell Biol* 2014, **16**(6):488-494.
78. Santibáñez JF, Kocić J, Fabra A, Cano A, Quintanilla M: **Rac1 modulates TGF-beta1-mediated epithelial cell plasticity and MMP9 production in transformed keratinocytes.** *FEBS Lett* 2010, **584**(11):2305-2310.
79. Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L: **C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms.** *Science* 2002, **296**(5571):1308-1313.
80. Mège RM, Ishiyama N: **Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017, **9**(5).
81. Glouhankova NA, Rubtsova SN, Zhitnyak IY: **Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells.** *Tissue Barriers* 2017, **5**(3):e1356900.
82. Harrison OJ, Jin X, Hong S, Bahna F, Ahlsen G, Brasch J, Wu Y, Vendome J, Felsovalyi K, Hampton CM *et al*: **The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins.** *Structure* 2011, **19**(2):244-256.
83. Hansen SD, Kwiatkowski AV, Ouyang CY, Liu H, Pokutta S, Watkins SC, Volkmann N, Hanein D, Weis WI, Mullins RD *et al*:  **$\alpha$ E-catenin actin-binding domain alters actin filament conformation and regulates binding of nucleation and disassembly factors.** *Mol Biol Cell* 2013, **24**(23):3710-3720.
84. Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS: **Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(19):8813-8817.
85. Hartsock A, Nelson WJ: **Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1778**(3):660-669.
86. Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB: **A core function for p120-catenin in cadherin turnover.** *J Cell Biol* 2003, **163**(3):525-534.
87. Xiao K, Oas RG, Chiasson CM, Kowalczyk AP: **Role of p120-catenin in cadherin trafficking.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1773**(1):8-16.
88. Ehrlich JS, Hansen MD, Nelson WJ: **Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion.** *Dev Cell* 2002, **3**(2):259-270.
89. Sander EE, van Delft S, ten Klooster JP, Reid T, van der Kammen RA, Michiels F, Collard JG: **Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase.** *J Cell Biol* 1998, **143**(5):1385-1398.

90. Hage B, Meinel K, Baum I, Giehl K, Menke A: **Rac1 activation inhibits E-cadherin-mediated adherens junctions via binding to IQGAP1 in pancreatic carcinoma cells.** *Cell Commun Signal* 2009, **7**:23.
91. Takada Y, Ye X, Simon S: **The integrins.** *Genome Biol* 2007, **8**(5):215.
92. Hynes RO: **Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.** *Cell* 2002, **110**(6):673-687.
93. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA: **Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3.** *Science* 2001, **294**(5541):339-345.
94. Springer TA: **Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(1):65-72.
95. Liddington RC, Ginsberg MH: **Integrin activation takes shape.** *J Cell Biol* 2002, **158**(5):833-839.
96. Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC: **Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1.** *Cell* 2000, **101**(1):47-56.
97. Srichai MB, Zent R: **Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer:** Springer Science+Business Media; 2010.
98. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D: **Integrins.** *Cell Tissue Res* 2010, **339**(1):269-280.
99. Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B: **Functional atlas of the integrin adhesome.** *Nat Cell Biol* 2007, **9**(8):858-867.
100. Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH: **Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling.** *J Biol Chem* 2000, **275**(30):22607-22610.
101. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM: **Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**(11):793-805.
102. Giancotti FG, Ruoslahti E: **Integrin signaling.** *Science* 1999, **285**(5430):1028-1032.
103. Guan JL: **Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer.** *IUBMB Life* 2010, **62**(4):268-276.
104. Cai X, Lietha D, Ceccarelli DF, Karginov AV, Rajfur Z, Jacobson K, Hahn KM, Eck MJ, Schaller MD: **Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**(1):201-214.
105. Polte TR, Hanks SK: **Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(23):10678-10682.
106. Wu X, Gan B, Yoo Y, Guan JL: **FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation.** *Dev Cell* 2005, **9**(2):185-196.
107. Schaller MD: **Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein.** *Oncogene* 2001, **20**(44):6459-6472.
108. Turner CE, Glenney JR, Burridge K: **Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions.** *J Cell Biol* 1990, **111**(3):1059-1068.
109. Gilmore AP, Burridge K: **Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate.** *Nature* 1996, **381**(6582):531-535.
110. Harrison RG: **Observations on the living developing nerve fiber.** New York?: s.n.; 1907.
111. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L: **Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors.** *Assay Drug Dev Technol* 2014, **12**(4):207-218.
112. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z: **Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture.** *Physiology (Bethesda)* 2017, **32**(4):266-277.
113. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K: **2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures.** *Arch Med Sci* 2018, **14**(4):910-919.
114. Baker BM, Chen CS: **Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues.** *J Cell Sci* 2012, **125**(Pt 13):3015-3024.
115. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA: **Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge?** *Int J Radiat Biol* 2007, **83**(11-12):849-871.
116. Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS: **Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy.** *J Transl Med* 2006, **4**:12.
117. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J: **Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?** *Int J Mol Sci* 2018, **19**(1).

118. Cukierman E, Pankov R, Yamada KM: **Cell interactions with three-dimensional matrices.** *Curr Opin Cell Biol* 2002, **14**(5):633-639.
119. Schwarz RP, Goodwin TJ, Wolf DA: **Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity.** *J Tissue Cult Methods* 1992, **14**(2):51-57.
120. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG: **Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor.** *J Biomed Mater Res* 2002, **62**(1):136-148.
121. Kim JB: **Three-dimensional tissue culture models in cancer biology.** *Semin Cancer Biol* 2005, **15**(5):365-377.
122. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ: **A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids.** *Cancer Res* 1977, **37**(10):3639-3643.
123. Ivascu A, Kubbies M: **Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis.** *J Biomol Screen* 2006, **11**(8):922-932.
124. Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD, Takayama S: **Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy.** *J Control Release* 2012, **164**(2):192-204.
125. Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, Bronk LF, Ananta JS, Mandelin J, Georgescu MM *et al*: **Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation.** *Nat Nanotechnol* 2010, **5**(4):291-296.
126. Tseng H, Gage JA, Raphael RM, Moore RH, Killian TC, Grande-Allen KJ, Souza GR: **Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation.** *Tissue Eng Part C Methods* 2013, **19**(9):665-675.
127. Elsdale T, Bard J: **Collagen substrata for studies on cell behavior.** *J Cell Biol* 1972, **54**(3):626-637.
128. Kleinman HK, Martin GR: **Matrigel: basement membrane matrix with biological activity.** *Semin Cancer Biol* 2005, **15**(5):378-386.
129. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ: **Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures.** *J Cell Biol* 1988, **107**(4):1589-1598.
130. Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ: **Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**(1):136-140.
131. Caliani SR, Burdick JA: **A practical guide to hydrogels for cell culture.** *Nat Methods* 2016, **13**(5):405-414.
132. Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ: **Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells.** *Nat Methods* 2007, **4**(4):359-365.
133. Tanaka M, Herr W: **Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2: interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation.** *Cell* 1990, **60**(3):375-386.
134. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B *et al*: **Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.** *Nat Methods* 2012, **9**(7):676-682.
135. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985, **150**(1):76-85.
136. Hinck L, Näthke IS, Papkoff J, Nelson WJ: **Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly.** *J Cell Biol* 1994, **125**(6):1327-1340.
137. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
138. Lee T, Lee B, Choi YL, Han J, Ahn MJ, Um SW: **Non-small Cell Lung Cancer with Concomitant EGFR, KRAS, and ALK Mutation: Clinicopathologic Features of 12 Cases.** *J Pathol Transl Med* 2016, **50**(3):197-203.
139. Tian Y, Xu L, He Y, Xu X, Li K, Ma Y, Gao Y, Wei D, Wei L: **Knockdown of RAC1 and VASP gene expression inhibits breast cancer cell migration.** *Oncol Lett* 2018, **16**(2):2151-2160.
140. Guo X, Wang M, Jiang J, Xie C, Peng F, Li X, Tian R, Qin R: **Balanced Tiam1-rac1 and RhoA drives proliferation and invasion of pancreatic cancer cells.** *Mol Cancer Res* 2013, **11**(3):230-239.

141. Liu L, Zhang H, Shi L, Zhang W, Yuan J, Chen X, Liu J, Zhang Y, Wang Z: **Inhibition of Rac1 activity induces G1/S phase arrest through the GSK3/cyclin D1 pathway in human cancer cells.** *Oncol Rep* 2014, **32**(4):1395-1400.
142. Mebratu Y, Tesfaigzi Y: **How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?** *Cell Cycle* 2009, **8**(8):1168-1175.
143. Li G, Ying L, Wang H, Wei SS, Chen J, Chen YH, Xu WP, Jie QQ, Zhou Q, Li YG *et al*: **Rac1b enhances cell survival through activation of the JNK2/c-JUN/Cyclin-D1 and AKT2/MCL1 pathways.** *Oncotarget* 2016, **7**(14):17970-17985.
144. Fiszer-Kierzkowska A, Vydra N, Wysocka-Wycisk A, Kronekova Z, Jarzab M, Lisowska KM, Krawczyk Z: **Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells.** *BMC Mol Biol* 2011, **12**:27.
145. Song M, Bode AM, Dong Z, Lee MH: **AKT as a Therapeutic Target for Cancer.** *Cancer Res* 2019, **79**(6):1019-1031.
146. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ: **Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.** *Genes Dev* 1998, **12**(22):3499-3511.
147. Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T: **GSK-3beta regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy.** *Cell Signal* 2008, **20**(4):581-589.
148. Mancinelli R, Carpino G, Petrunaro S, Mammola CL, Tomaipitnca L, Filippini A, Facchiano A, Ziparo E, Giampietri C: **Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and Autophagy-Related Diseases.** *Oxid Med Cell Longev* 2017, **2017**:4629495.
149. Lamouille S, Xu J, Derynck R: **Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**(3):178-196.
150. Saitoh M: **Involvement of partial EMT in cancer progression.** *J Biochem* 2018, **164**(4):257-264.
151. Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M: **Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems.** *Cell* 1988, **54**(7):993-1001.
152. Derycke LD, Bracke ME: **N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling.** *Int J Dev Biol* 2004, **48**(5-6):463-476.
153. Fritz RD, Pertz O: **The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: formation of signaling patterns.** *F1000Res* 2016, **5**.
154. Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, Weinberg RA: **EMT, cell plasticity and metastasis.** *Cancer Metastasis Rev* 2016, **35**(4):645-654.
155. Ungefroren H, Witte D, Lehnert H: **The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- $\beta$ -induced EMT and cell motility in cancer.** *Dev Dyn* 2018, **247**(3):451-461.
156. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR: **Cell migration: integrating signals from front to back.** *Science* 2003, **302**(5651):1704-1709.
157. Zarzynska JM: **Two faces of TGF-beta1 in breast cancer.** *Mediators Inflamm* 2014, **2014**:141747.
158. Esufali S, Bapat B: **Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation.** *Oncogene* 2004, **23**(50):8260-8271.
159. Busche S, Descot A, Julien S, Genth H, Posern G: **Epithelial cell-cell contacts regulate SRF-mediated transcription via Rac-actin-MAL signalling.** *J Cell Sci* 2008, **121**(Pt 7):1025-1035.
160. Atfi A, Djelloul S, Chastre E, Davis R, Gespach C: **Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling.** *J Biol Chem* 1997, **272**(3):1429-1432.
161. Gualdrini F, Esnault C, Horswell S, Stewart A, Matthews N, Treisman R: **SRF Co-factors Control the Balance between Cell Proliferation and Contractility.** *Mol Cell* 2016, **64**(6):1048-1061.
162. Hill CS, Wynne J, Treisman R: **Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain.** *EMBO J* 1994, **13**(22):5421-5432.
163. Posern G, Treisman R: **Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction.** *Trends Cell Biol* 2006, **16**(11):588-596.
164. Esufali S, Charames GS, Pethe VV, Buongiorno P, Bapat B: **Activation of tumor-specific splice variant Rac1b by dishevelled promotes canonical Wnt signaling and decreased adhesion of colorectal cancer cells.** *Cancer Res* 2007, **67**(6):2469-2479.

165. Shapiro M, Akiri G, Chin C, Wisnivesky JP, Beasley MB, Weiser TS, Swanson SJ, Aaronson SA: **Wnt pathway activation predicts increased risk of tumor recurrence in patients with stage I nonsmall cell lung cancer.** *Ann Surg* 2013, **257**(3):548-554.
166. Faria M, Matos P, Pereira T, Cabrera R, Cardoso BA, Bugalho MJ, Silva AL: **RAC1b overexpression stimulates proliferation and NF- $\kappa$ B-mediated anti-apoptotic signaling in thyroid cancer cells.** *PLoS One* 2017, **12**(2):e0172689.
167. Matos P, Jordan P: **Expression of Rac1b stimulates NF- $\kappa$ B-mediated cell survival and G1/S progression.** *Exp Cell Res* 2005, **305**(2):292-299.
168. Guo Y, Kenney SR, Cook L, Adams SF, Rutledge T, Romero E, Oprea TI, Sklar LA, Bedrick E, Wiggins CL *et al*: **A Novel Pharmacologic Activity of Ketorolac for Therapeutic Benefit in Ovarian Cancer Patients.** *Clin Cancer Res* 2015, **21**(22):5064-5072.
169. Longmate W, DiPersio CM: **Beyond adhesion: emerging roles for integrins in control of the tumor microenvironment.** *F1000Res* 2017, **6**:1612.
170. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, Gong Z, Zhang S, Zhou J, Cao K *et al*: **Role of tumor microenvironment in tumorigenesis.** *J Cancer* 2017, **8**(5):761-773.
171. Shintani Y, Maeda M, Chaika N, Johnson KR, Wheelock MJ: **Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, **38**(1):95-104.
172. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P: **Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture.** *Nature* 1977, **267**(5611):531-532.
173. Benya PD, Shaffer JD: **Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels.** *Cell* 1982, **30**(1):215-224.
174. Fardi M, Alivand M, Baradaran B, Farshdousti Hagh M, Solali S: **The crucial role of ZEB2: From development to epithelial-to-mesenchymal transition and cancer complexity.** *J Cell Physiol* 2019.
175. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Berx G: **SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(20):6566-6578.
176. Bindels S, Mestdagt M, Vandewalle C, Jacobs N, Volders L, Noël A, van Roy F, Berx G, Foidart JM, Gilles C: **Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells.** *Oncogene* 2006, **25**(36):4975-4985.
177. Hou Y, Zhen J, Xu X, Zhen K, Zhu B, Pan R, Zhao C: **miR-215 functions as a tumor suppressor and directly targets ZEB2 in human non-small cell lung cancer.** *Oncol Lett* 2015, **10**(4):1985-1992.
178. Dassah M, Almeida D, Hahn R, Bonaldo P, Worgall S, Hajjar KA: **Annexin A2 mediates secretion of collagen VI, pulmonary elasticity and apoptosis of bronchial epithelial cells.** *J Cell Sci* 2014, **127**(Pt 4):828-844.
179. Mereness JA, Bhattacharya S, Wang Q, Ren Y, Pryhuber GS, Mariani TJ: **Type VI collagen promotes lung epithelial cell spreading and wound-closure.** *PLoS One* 2018, **13**(12):e0209095.
180. Bonnans C, Chou J, Werb Z: **Remodelling the extracellular matrix in development and disease.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**(12):786-801.
181. Wyganowska-Świątkowska M, Tarnowski M, Murtagh D, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J: **Proteolysis is the most fundamental property of malignancy and its inhibition may be used therapeutically (Review).** *Int J Mol Med* 2019, **43**(1):15-25.
182. Leeman MF, Curran S, Murray GI: **The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002, **37**(3):149-166.
183. Uría JA, Stähle-Bäckdahl M, Seiki M, Fueyo A, López-Otín C: **Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions.** *Cancer Res* 1997, **57**(21):4882-4888.
184. Johansson N, Airola K, Grénman R, Kariniemi AL, Saarialho-Kere U, Kähäri VM: **Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck.** *Am J Pathol* 1997, **151**(2):499-508.
185. Riedl A, Schleder M, Pudelko K, Stadler M, Walter S, Unterleuthner D, Unger C, Kramer N, Hengstschläger M, Kenner L *et al*: **Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses.** *J Cell Sci* 2017, **130**(1):203-218.
186. Zarubin T, Han J: **Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway.** *Cell Res* 2005, **15**(1):11-18.

187. Breslin S, O'Driscoll L: **Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery.** *Drug Discov Today* 2013, **18**(5-6):240-249.
188. Cichon MA, Gainullin VG, Zhang Y, Radisky DC: **Growth of lung cancer cells in three-dimensional microenvironments reveals key features of tumor malignancy.** *Integr Biol (Camb)* 2012, **4**(4):440-448.
189. Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J: **Clinical development success rates for investigational drugs.** *Nat Biotechnol* 2014, **32**(1):40-51.

## 10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.

Gießen, den

---

Julia Raphaela Seiz

## 11 Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen Leuten bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei...

- ... Prof. Dr. Andre Menke für die Möglichkeit meine Promotion in deiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, für das interessante Projekt, sowie für dein großes Engagement und deine gute Betreuung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- ... Prof. Dr. Klaudia Giehl für deine Unterstützung und für die Diskussion meiner Ergebnisse.
- ... Prof. Dr. Undraga Schagdarsurengin für die Übernahme des Erstgutachtens und deine Unterstützung bei meiner Promotion.
- ... Chris, Johannes, Angela, Marisa, Steffi, Dirk, Heike, Amanda, Tara und Marcel für eure Unterstützung und Freundschaft innerhalb und außerhalb des Labors und die vielen lustigen, gemeinsame Labormomente. Mit euch hat es immer viel Spaß gemacht und ich werde es vermissen, mit euch zusammen zu arbeiten.
- ... Pia und Michael für die schönen Stunden, in denen ich die Doktorarbeit auch mal kurz vergessen konnte. Ihr habt mich immer unterstützt und dafür danke ich euch.
- ... meinen Eltern für ihre jahrelange Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion. Ihr wart immer für mich da und habt mich in guten und in schwierigen Zeiten immer unterstützt.
- ... Tim für seine Unterstützung, für die unendliche Geduld in stressigen Zeiten und dafür, dass du mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt hast. Du hast mir auch die Kraft gegeben, diese Arbeit erfolgreich zu beenden.

## 12 Anhang

### 12.1 Ergänzende Abbildungen

	H358	H23
<b>A</b>	<b>Matrigel</b>	<b>Kollagen I</b>
	MMP13 ITGA1 ANOS1 ICAM1 SPP1 COL6A1 ITGB4 LAMB3 ITGB2 ITGB3 COL6A2	MMP16 ITGA2 COL8A1 MMP11 CTGF
	hochreguliert	
<b>B</b>	<b>Matrigel</b>	<b>Kollagen I</b>
	COL16A1 ECM1  COL6A2 LAMA2 SPP1 ITGA7  THBS1 ITGA1 MMP16 CDH1 ITGAM COL15A1 TGFB1 CTGF ADAMTS8 MMP2 MMP10 ITGA2 COL12A1 COL4A2 VCAN ITGA4 FN1	COL6A1 ITGB4 MMP11 COL6A2 LAMA2 SPP1 ITGA7  THBS1 ITGA1 MMP16 CDH1 ITGAM COL15A1 TGFB1 CTGF ADAMTS8 MMP2 MMP10 ITGA2 COL12A1 COL4A2 VCAN ITGA4 FN1
	hochreguliert	herunterreguliert

**Abbildung 39: Auflistung der durch die 3D-Kultivierung regulierten Gene in H358- und H23-Zellen.**

Mithilfe der Auswertungssoftware von Qiagen wurde die x-fache Regulation aller analysierten Gene in den 3D-kultivierten verglichen mit den 2D-kultivierten [A] H358- oder [B] H23-Zellen berechnet. Ab einem 2-fachen Unterschied in der relativen Expression zwischen den 2D- und 3D-kultivierten Zellen wurden die Gene als reguliert definiert und hier aufgelistet.

Position	RefSeq Number	Symbol	Description
D11	NM_000426	LAMA2	Laminin, alpha 2
D12	NM_000227	LAMA3	Laminin, alpha 3
E01	NM_002291	LAMB1	Laminin, beta 1
E02	NM_000228	LAMB3	Laminin, beta 3
E03	NM_002293	LAMC1	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)
E04	NM_002421	MMP1	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)
E05	NM_002425	MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
E06	NM_005940	MMP11	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
E07	NM_002426	MMP12	Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)
E08	NM_002427	MMP13	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)
E09	NM_004995	MMP14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
E10	NM_002428	MMP15	Matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)
E11	NM_005941	MMP16	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)
F01	NM_004530	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
F02	NM_002423	MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterin)
F03	NM_002424	MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)
F04	NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
F05	NM_000615	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
F06	NM_000442	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
F07	NM_000450	SELE	Selectin E
F08	NM_000655	SELL	Selectin L
F09	NM_003005	SELP	Selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)
F10	NM_003919	SGCE	Sarcoglycin, epsilon
F11	NM_003118	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
F12	NM_003119	SPC7	Spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)
G01	NM_000582	SPP1	Secreted phosphoprotein 1
G02	NM_000358	TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
G03	NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1
G04	NM_003247	THBS2	Thrombospondin 2
G05	NM_007112	THBS3	Thrombospondin 3
G06	NM_003254	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
G07	NM_003255	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
G08	NM_000362	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
G09	NM_002160	TNC	Tenascin C
G10	NM_001078	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
G11	NM_004385	VCAN	Versican
G12	NM_000638	VTN	Vitronectin
H01	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	NM_000194	HPL1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

Position	RefSeq Number	Symbol	Description
A01	NM_000988	ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1
A02	NM_139025	ADAMTS13	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 13
A03	NM_007037	ADAMTS8	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8
A04	NM_000610	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
A05	NM_004360	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
A06	NM_003278	CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B
A07	NM_001843	CNTN1	Contactin 1
A08	NM_080629	COL1A1	Collagen, type XI, alpha 1
A09	NM_004370	COL12A1	Collagen, type XII, alpha 1
A10	NM_021110	COL14A1	Collagen, type XIV, alpha 1
A11	NM_001855	COL15A1	Collagen, type XV, alpha 1
A12	NM_001856	COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1
B01	NM_000088	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1
B02	NM_001846	COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2
B03	NM_000093	COL5A1	Collagen, type V, alpha 1
B04	NM_001848	COL6A1	Collagen, type VI, alpha 1
B05	NM_001849	COL6A2	Collagen, type VI, alpha 2
B06	NM_000094	COL7A1	Collagen, type VII, alpha 1
B07	NM_001850	COL8A1	Collagen, type VIII, alpha 1
B08	NM_001901	CTGF	Connective tissue growth factor
B09	NM_001903	CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa
B10	NM_001904	CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
B11	NM_001331	CTNND1	Catenin (cadherin-associated protein), delta 1
B12	NM_001332	CTNND2	Catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (neural plakophilin-related arm-repeat protein)
C01	NM_004425	ECM1	Extracellular matrix protein 1
C02	NM_002026	FN1	Fibronectin 1
C03	NM_001523	HAS1	Hyaluronan synthase 1
C04	NM_000201	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
C05	NM_181501	ITGA1	Integrin, alpha 1
C06	NM_002203	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49b, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
C07	NM_002204	ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49c, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
C08	NM_000885	ITGA4	Integrin, alpha 4 (antigen CD49d, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
C09	NM_002205	ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
C10	NM_000210	ITGA6	Integrin, alpha 6
C11	NM_002206	ITGA7	Integrin, alpha 7
C12	NM_003638	ITGA8	Integrin, alpha 8
D01	NM_002209	ITGAL	Integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)
D02	NM_000632	ITGAM	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
D03	NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
D04	NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
D05	NM_000211	ITGB2	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
D06	NM_000212	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
D07	NM_000213	ITGB4	Integrin, beta 4
D08	NM_002213	ITGB5	Integrin, beta 5
D09	NM_000216	ANOS1	Kallmann syndrome 1 sequence
D10	NM_005559	LAMA1	Laminin, alpha 1

**Abbildung 40: Gentabelle der RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array „Extrazelluläre Matrix- & Adhäsionsmoleküle“.** Jedes Well enthält spezifische Primerpaare, die eine Amplifikation des entsprechenden Gens ermöglichen. Well H02 und H03 enthalten die Haushaltsgene B2M und GAPDH, die für die Normalisierung herangezogen wurden und Well H07-H12 dienen der Qualitätskontrolle.

## 12.2 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

### Wissenschaftliche Publikationen

Bensch F, Buck A, Günther SC, Seiz JR, Tacke M, Pfeifer D, von Elverfeldt D, Sevenich L, Hillebrand LE, Kern U, Sameni M, Peters C, Sloane BF, Reinheckel T. *Cell type-dependent pathogenic functions of overexpressed human cathepsin B in murine breast cancer progression*. *Oncogene*. **2014** Sep 4;33(36):4474-84.

Wanzel M, Vischedyk JB, Gittler MP, Gremke N, Seiz JR, Hefter M, Noack M, Savai R, Mernberger M, Charles JP, Schneikert J, Bretz AC, Nist A, Stiewe T. *CRISPR-Cas9-based target validation for p53-reactivating model compounds*. *Nat Chem Biol*. **2016** Jan;12(1):22-8.

### 12.3 Konferenzbeiträge

Seiz JR, Lohfink D, Klinke J, Heipel M, Giehl K and Menke A (2016): **Different effects of Rac1 and Rac1b in lung adenocarcinoma cells.** *20th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): Signal Transduction, Mediators and Genes.* Weimar, November 2016. (Poster Seiz JR)

Seiz JR, Lohfink D, Klinke J, Heipel M, Sauer M, Giehl K and Menke A (2016): **The role of Rac1 and Rac1b in Lung Cancer.** *8. Nachwuchswissenschaftler-Meeting "Young Scientists meet experience" veranstaltet durch die GBM-Studiengruppe "Biochemische Pharmakologie und Toxikologie.* Günzburg, Dezember 2016. (Vortrag Seiz JR)

Seiz JR, Moyer J, Menke A (2017): **3D Cultivation of Lung Cancer Cell Lines.** *21th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): Signal Transduction, Mediators and Genes.* Weimar, November 2017. (Poster Seiz JR)