

**Charakterisierung der molekularen
Mechanismen der K-Ras/Akt-regulierten
Motilität sowie der Funktion von Akt-
Effektoren in Karzinomzelllinien mit
onkogenem K-Ras**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Angela Lammert
aus Braunfels
im November 2018

Die vorliegende Arbeit wurde an der Professur für Signaltransduktion zellulärer Motilität, des Fachbereiches 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Oktober 2013 bis Oktober 2018 unter Leitung von Prof. Dr. Klaudia Giehl angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann
Institut für Genetik
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Klaudia Giehl
Professur für Signaltransduktion zellulärer Motilität
Justus-Liebig-Universität Gießen
Aulweg 128, 35392 Gießen

Datum der Dissertation: 21. Januar 2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iv
Zusammenfassung.....	viii
<i>Abstract</i>	ix
1. Einleitung.....	1
1.1 Krebs, Metastasierung und Zellmotilität.....	1
1.2 Zellmigration.....	2
1.3 Die Bedeutung des MAP-Kinase MEK-ERK-Signalweges für die Tumorgenese	3
1.4 Struktur und Funktion von Ras-Proteinen.....	4
1.5 Der PI3-K/Akt-Signalweg in der Tumorgenese.....	6
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2. Material	15
2.1 Chemikalien.....	15
2.2 Enzymsubstrate.....	17
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.4 Zelllinien	18
2.5 Antikörper.....	19
2.6 Wachstumsfaktoren und pharmakologische Substanzen.....	22
2.7 siRNA-Sequenzen.....	23
2.8 qPCR-Primer	23
2.9 Molekularbiologische Reagenzien	24
2.10 Geräte	25
2.11 Software	26
3. Methoden.....	27
3.1 Zellbiologische Methoden.....	27
3.2 Proteinbiochemische Methoden.....	33
3.3 Molekularbiologische Methoden	45
3.4 Statistik	47
4. Ergebnisse	48
4.1 Effekt von EGFP-K-Ras(V12) auf die Expression und Aktivität der Akt-Isoformen.....	48
4.2 Expression der Akt-Isoformen in etablierten Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien.....	55
4.3 Charakterisierung des Phänotyps und Expressionsanalyse verschiedener EMT-Marker-Proteine.....	61
4.4 Charakterisierung der Akt-abhängigen Signaltransduktion.....	63
4.5 Charakterisierung der Kinase-Aktivität der drei Akt-Isoformen.....	72
4.6 Charakterisierung der PI3-K/Akt-abhängigen Signaltransduktion.....	78

Inhaltsverzeichnis

4.7 Die Bedeutung des Akt-mTOR-S6-Signalweges und der einzelnen Akt-Isoformen für die Zellmigration.....	82
4.8 Einfluss von MDM2 und p53 auf Akt-abhängige Signalwege und die Migration.....	92
4.9 Einfluss von MEK1/2 auf die Zellmigration.....	97
4.10 Effekte einer Akt-Aktivierung auf das Aktin-Zytoskelett.....	100
4.11 Identifizierung und Verifizierung putativer Akt3-Substrate	105
5. Diskussion	111
5.1 Einfluss von EGFP-K-Ras(V12) auf die Expression und Aktivität der Akt-Isoformen ...	111
5.2. Expression der Akt-Isoformen in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien	113
5.3 Die Expression von EMT-Markern und der Phänotyp von Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien	114
5.4 PI3-K/Akt-abhängige Signalwege in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien	115
5.5 Interaktion der Akt-Kinasen mit dem MEK-ERK-Signalweg.....	117
5.6 Die distinkte Kinase-Aktivität von Akt1, Akt2 und Akt3	119
5.7 Die Bedeutung der Akt-Kinasen und des Akt-Effektors mTOR für die Migration.....	120
5.8 Die Rolle der Akt-Isoformen in der Regulation der Migration.....	121
5.9 Die Rolle von MDM2 und p53 in der Migration.....	123
5.10 Mechanismen der Regulation von Migrationsprozessen durch Akt.....	125
6. Literaturverzeichnis.....	128
7. Erklärung.....	137
8. Danksagung	138
9. Konferenzbeiträge & Auszeichnungen.....	139
10. Anhang.....	140

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeines

4E-BP1	<i>4E-binding protein 1</i>
Abb.	Abbildung
ANKRD2	<i>Ankyrin repeat domain-containing protein 2</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection Number</i>
ATP	<i>Adenosine 5'-triphosphate disodium salt</i>
BCA	<i>Bichinchoninic acid assay</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Kodierende DNA
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CMF-PBS	<i>Calcium- and magnesium-free phosphate buffered saline</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
del	Deletiert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCK	<i>Dedicator of cytokinesis</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTC	<i>Lung cancer derived disseminated tumor cell</i>
DTT	1,4-Dithiothreit
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescence protein</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	Epitheliale zu mesenchymale Transition
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FCS	Fötales bovines Serum
FGF-2	<i>Fibroblast-like growth factor-2</i>
FoxO	<i>Forkhead box O</i>
G418-Sulfat	Genitizin 418-Sulfat
GAP	<i>GTPase activating protein</i>

Abkürzungsverzeichnis

GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GSK3 α/β	Glykogen-Synthase-Kinasen- α /und - β
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IGFR	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MEK oder MAP2K	MAPK/ERK-Kinase oder <i>dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase</i>
miR	Micro-RNA
mk	Monoklonal
MP	Milchpulver
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mt	Mutiert
mTORC1/2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1/2</i>
MYO1E	Myosin 1E
n	Anzahl der Bestimmungen
Na-Pyrophosphat	Tetra-Natriumpyrophosphat Decahydrat
NBT	4-Nitroblau Tetrazolim Chlorid
NFAT1	<i>Nuclear factor of activated T-cells 1</i>
NHS	<i>Nance-Horan syndrome</i>
NP-40	Nonidet P-40
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>
p	Phosphoryliert
p70S6K	p70S6-Kinase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDAC	Duktales Pankreasadenokarzinom
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PH-Domäne	<i>Pleckstrin homology-Domäne</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidyl-Inositol-Trisphosphat
pk	Polyklonal

Abkürzungsverzeichnis

PKB	Protein Kinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
PRAS40	<i>Proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTM	<i>Post-translationally modified</i>
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK1/2	<i>Rho-associated proteine kinase 1/2</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSK	<i>p90-ribosomal-S6-kinase</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
qPCR	Reverse-Transkriptase quantitative Polymerasekettenreaktion
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SCLC	<i>Small cell lung cancer</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SiR	Silikon Rhodamin
siRNA	<i>Silencer RNA</i>
t	Zeitpunkt
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS/T	<i>Tris buffered saline + 0.2 % Tween20®</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TNBCs	<i>Triple-negative ERBB-receptor breast cancer cells</i>
TSC1/2	<i>Tuberous sclerosis complex 1/2</i>
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp
z. B.	Zum Beispiel

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

µl	Mikroliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
M	Molar (Mol pro Liter)
m/V	Verhältnis Masse zu Volumen
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
rpm	<i>Rounds per minute</i>
V	Volt
V/V	Verhältnis Volumen zu Volumen
x g	Erdbeschleunigung

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Zusammenfassung

Die Proteinfamilie der Akt-Kinasen besteht aus drei Mitgliedern, namentlich Akt1, Akt2 und Akt3. Die Akt-Kinasen sind hauptsächlich in der Regulation der Zellproliferation, des Überlebens, des Metabolismus und der Zellmigration involviert. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass nach stabiler Expression von onkogenem K-Ras(V12) die Ausbildung eines invasiven und motilen Phänotyps der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 induziert wurde. Die Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase(PI3-K)/Akt-Signalweges wurde dabei als essentiell für die K-Ras(V12)-induzierte Zellmotilität identifiziert. Die Analysen der vorliegenden Arbeit wiesen in EGFP-K-Ras(V12)-exprimierenden PANC-1-Zellklonen eine veränderte Expression der Akt-Isoformen sowie eine basal erhöhte Akt3-Aktivität nach. Aufbauend darauf wurden die individuelle Expression und Aktivität der Akt-Isoformen in etablierten Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien analysiert. Die Expressionsanalysen zeigten eine differentielle Akt1-, Akt2- und Akt3-Expression. In isoformspezifischen *in vitro* Akt-Kinase-Assays konnte in den Lungenkarzinomzelllinien COLO-699 und H23 eine deutliche, *epidermal growth factor* (EGF)-induzierte Akt3-Aktivität detektiert werden, während in PANC-1 Zellen alle Akt-Isoformen in unterschiedlicher Stärke durch EGF aktiviert wurden. Für die Akt-Isoformen ist bekannt, dass sie eine individuelle Rolle in der Zellmigration in Abhängigkeit von der Zelllinie einnehmen können. Daher wurde in *Wounding-Assays* die Rolle der Akt-Kinasen und der einzelnen Akt-Isoformen in der Migration analysiert. In Assays mit PANC-1 und COLO-699 Zellen konnte nach Behandlung mit einem pan-Akt-Inhibitor eine deutlich verminderte Migration dokumentiert werden. In weiteren Studien wurden Akt1, Akt2 und Akt3 siRNA-vermittelt depletiert. Die Akt1-Depletion inhibierte die Migration von PANC-1 Zellen, PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Zellklonen und H23 Zellen. Die Depletion von Akt2 oder Akt3 zeigte keinen Effekt auf die Migration dieser Zellen, mit Ausnahme von PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Zellklonen, deren Motilität nach Akt2-Depletion gehemmt wurde. Um die zugrundeliegenden Akt-abhängigen Signalwege zu charakterisieren, wurden die Zellen mit spezifischen Inhibitoren und dem Akt-Aktivator SC-79 behandelt. In den Analysen von COLO-699 und PANC-1 Zellen konnten S6 und MDM2 als Akt-Substrate identifiziert werden. Um weitere Akt-Effektoren zu identifizieren, wurde ein Phospho-Akt-Substrat Proteom-Scan mit SC-79-behandelten H23 Zellen durchgeführt. In dieser Analyse konnten über 700 putative Akt-regulierte Phosphopeptide ermittelt werden. Einige dieser Akt-Effektoren sind an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt und könnten daher für die Migrationsregulation von Bedeutung sein. Insgesamt konnte somit erstmals ein K-Ras(V12)-abhängiger Effekt auf die Akt-Isoform-Expression und Akt3-Aktivität gezeigt werden und die Rolle der Akt-Isoformen in der Migration als auch die Akt-abhängige Signaltransduktion in Pankreas- und Lungenkarzinomzellen näher charakterisiert werden.

Abstract

The Akt family of protein kinases consists of three members, namely Akt1, Akt2 and Akt3. These kinases are mainly involved in the regulation of cell proliferation, survival, metabolism and cell migration. It was shown by our group, that stably expressed oncogenic K-Ras(V12) induces the development of an invasive and motile phenotype of the pancreatic carcinoma cell line PANC-1. Activation of the phosphoinositide-3-kinase (PI3-K)/Akt pathway was shown to be fundamental for K-Ras(V12)-induced cell migration. It was uncovered within this project, that PANC-1/EGFP-K-Ras(V12) cell clones display an altered expression of the Akt isoforms and an enhanced Akt3 activity. Based on these data, the individual expression and activity of the three Akt isoforms were investigated in established pancreatic and lung cancer cell lines. Expression analyses revealed a diverse expression pattern of Akt1, Akt2 and Akt3 in these cell lines. To characterize the individual activity of the Akt isoforms, isoform-specific *in vitro* Akt-kinase-assays were performed. Treatment with epidermal growth factor (EGF) induced a prominent Akt3 activity in COLO-699 and H23 lung cancer cells. The analysis of PANC-1 cells revealed a distinct, EGF-induced activity of Akt1, Akt2 and Akt3. Since the three Akt kinases are known to play individual roles in controlling cell migration of several other carcinoma cell lines, the role of the Akt kinases and the distinct Akt isoforms in cell migration were investigated in wound healing assays. The application of a pharmacological pan-Akt-inhibitor led to a strongly reduced cell motility of PANC-1 and COLO-699 cells. In further studies specific siRNA pools targeting the Akt isoforms were applied. The silencing of Akt1 reduced the migration rate of PANC-1, PANC-1/EGFP-K-Ras(V12) cell clones and H23 cells. Silencing of Akt2 and Akt3 did not affect the motility of the analyzed cells, with exception of PANC-1/EGFP-K-Ras(V12) cell clones showing a reduced migration rate upon Akt2 depletion. To characterize the underlying signal transduction pathways PANC-1, H23 and COLO-699 cells were treated with specific inhibitors and the Akt-activator SC-79. In studies of COLO-699 and PANC-1 cells S6 and MDM2 were identified as Akt-regulated effectors. To uncover other Akt-regulated effectors, SC-79-treated H23 cells were analyzed in a phospho-Akt-substrate proteomic screen. These studies revealed more than 700 putative Akt-regulated phosphopeptides, including proteins involved in the reorganization of the actin cytoskeleton. Thus, these proteins might be important for the regulation of migration. In summary this work showed for the first time a K-Ras(V12)-dependent effect on Akt isoform expression and Akt3 activity. Furthermore, the role of the Akt isoforms in cell migration of pancreatic and lung cancer cell lines was characterized and Akt-dependent signal transduction pathways were clarified.

1. Einleitung

1.1 Krebs, Metastasierung und Zellmotilität

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache in Deutschland und jeder vierte Todesfall kann auf eine maligne Tumorerkrankung zurückgeführt werden [1]. Die häufigste Krebsart ist bei Männern mit 25.3 % das Prostatakarzinom, während bei Frauen mit 30.8 % am häufigsten Brustkrebs diagnostiziert wird. Diese Krebsarten haben eine gute Heilungschance, da sie meist früh erkannt werden. Das Lungen- und das Pankreaskarzinom treten hingegen weniger häufig auf (13.7 % und 3.3 % bei Männern), weisen jedoch eine hohe Mortalitätsrate auf. Das Pankreaskarzinom ist mit einer sehr hohen Sterblichkeitsrate von über 90 % und einer geringen 5-Jahres-Überlebensrate von nur 8 % eine der tödlichsten Krebsarten. Das Lungenkarzinom ist mit einem Anteil von 25 % bei Männern und 15 % der Frauen die häufigste Krebstodesursache [2]. Die hohe Sterblichkeit ist darauf zurückzuführen, dass diese beiden Krebsarten meist erst in späten Stadien erkannt werden und aufgrund von meist bereits gebildeten Metastasen eine erfolgreiche Behandlung nicht mehr möglich ist. Da bisher keine wirksamen therapeutischen Ansätze zur Inhibition der Metastasierung in Pankreas- und Lungenkarzinomen existieren, ist es von großem Interesse die molekularen Mechanismen der Metastasierung aufzuklären und somit zur besseren Behandelbarkeit dieser malignen Tumorerkrankungen beizutragen.

Die Metastasierung von Tumorzellen wird in mehrere Stufen unterteilt, die in Abb. 1-1 dargestellt sind. Zuerst kommt es zur Dissemination und Migration der Zellen vom Primärtumor und zum Durchbrechen der Basalmembran, um im zweiten Schritt in die Zirkulation, d.h. in Blut- und Lymphgefäße, einzudringen. Dazu wird das Endothel der Gefäße durchbrochen und anschließend infiltriert. Die Tumorzellen zirkulieren nun im Gefäßsystem und können durch Extravasation in das Zielorgan eindringen und dieses anschließend besiedeln. Der Sekundärtumor, d. h. die Metastase, entsteht durch Proliferation der Zellen [3]. Ein wichtiger Bestandteil der Transformation einer Zelle in eine maligne Tumorzelle ist die Ausbildung eines mesenchymalen und somit motilen Phänotyps, der eine Metastasierung ermöglicht. Die meisten Tumorzellen (ca. 90 %) sind epithelialen Ursprungs und verändern ihren Phänotyp hin zu einer motilen, mesenchymalen Erscheinung durch den sogenannten Prozess der epithelialen zu mesenchymalen Transition (EMT). Der epitheliale Phänotyp ist durch eine starke Verankerung der Zellen untereinander charakterisiert, welche durch Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle sowie durch eine ausgebildete Zellpolarität mit basaler Anheftung auf der Basalmembran aufrechterhalten wird. Mesenchymale Zellen hingegen weisen weder eine Polarität auf, noch sind sie in einem Netzwerk mit anderen Zellen über Zell-Zell-Verbindungen

1. Einleitung

stark organisiert, was die Voraussetzung für eine hohe Motilität darstellt. Weiterhin besteht die Struktur ihres Zytoskeletts vor allem aus Aktin-Filamenten, die in Bündeln organisiert sind, so genannte Aktin-Stressfasern, die eine gerichtete Zellmigration ermöglichen. Zudem sind Zytoskelett-stabilisierende Proteine, wie z. B. Vimentin, stark exprimiert, um die Robustheit und Flexibilität der Zelle im Prozess der Migration zu verstärken [4, 5].

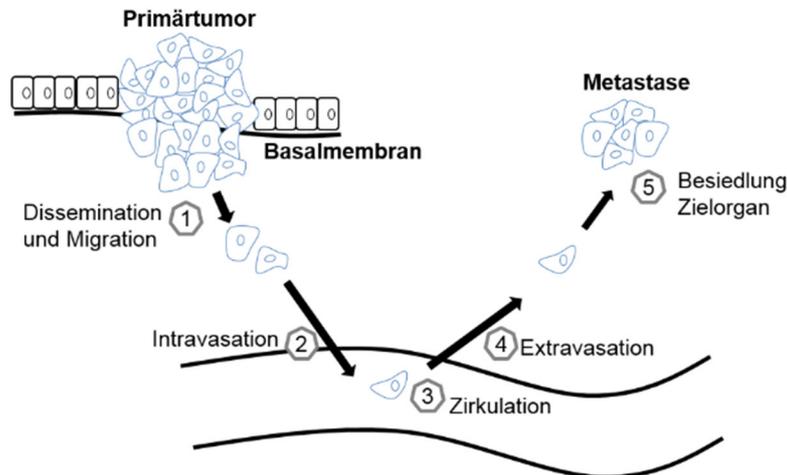


Abb. 1-1. Schritte zur Ausbildung von Metastasen. 1. Dissemination und Migration: Tumorzellen lösen sich aus dem Gewebeverband und durchstoßen die Basalmembran, 2. Intravasation: Durchdringen des Endothels und Eintritt in das Zirkulationssystem, 3. Zirkulation im Gefäßsystem, 4. Extravasation: Austritt aus dem Gefäßsystem in das Zielorgan, 5. Proliferation und Ausbildung der Metastase.

1.2 Zellmigration

Die Zellmigration selbst ist ein komplexer Prozess, in dessen Regulation eine Vielzahl an Signaltransduktionsprozessen involviert sind, da eine ständige Modifikation der zellulären Architektur, vor allem des Aktin-Zytoskeletts, für eine gerichtete Bewegung benötigt wird. Der Prozess der Zellmigration wird in mehrere Schritte unterteilt, welche in Abb. 1-2 zusammengefasst sind. Im ersten Schritt wird ein Lamellopodium an der migrierenden Front in Migrationsrichtung ausgebildet. Anschließend folgt die Bildung neuer Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle zur Stabilisierung der Führungslamelle und der Zellkörper wird dann im dritten Schritt durch Kontraktion nachgezogen. Abschließend werden am hinteren Ende des Zellkörpers verbliebende Zell-Matrix-Adhäsionen gelöst [6–8]. Als essentielle Organisatoren des komplexen Prozesses der Zellmigration konnte bereits die Familie der RhoGTPasen identifiziert werden [6,9,10]. In vielen weiteren Studien wurden vor allem die zu Grunde liegenden Signaltransduktionsprozesse untersucht, um die Regulationsprozesse der Zellmigration genauer zu charakterisieren (zusammengefasst von [8,11]).

1. Einleitung

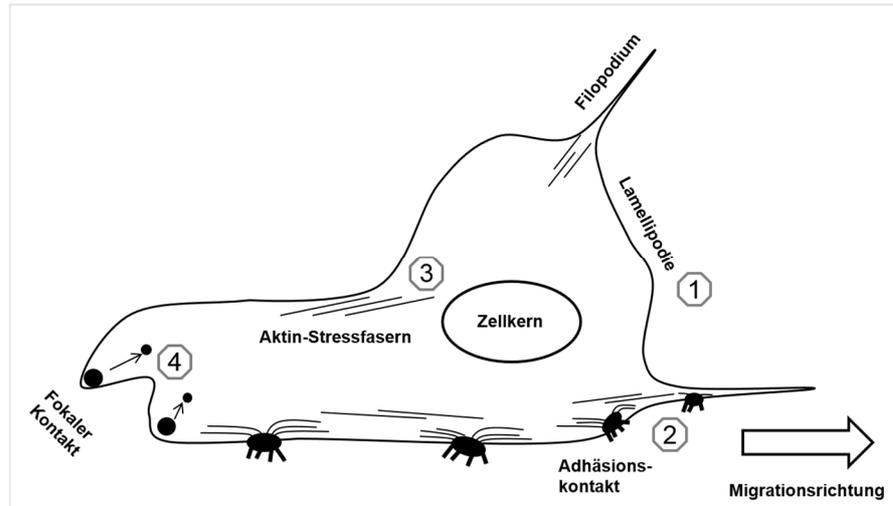


Abb. 1-2. Migration einer Zelle. 1. Ausbildung der Lamellipodie in Migrationsrichtung, 2. Ausbildung von Aktin-Stressfasern und Adhäsionskontakten unterhalb der Führungslamelle, 3. Kontraktion der Aktin-Stressfasern, 4. Auflösung der fokalen Kontakte am hinteren Teil der Zelle.

1.3 Die Bedeutung des MAP-Kinase MEK-ERK-Signalweges für die Tumorgenerese

Der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-MEK-ERK-Signalweg ist einer der wichtigsten Mediatoren zur intrazellulären Regulation von Zellwachstum, Proliferation und Motilität, der in vielerlei Tumortypen hyperaktiv ist oder dereguliert vorliegt [12]. Der Signalweg wird durch externe Stimuli, wie z. B. Wachstumsfaktoren und deren Bindung an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), wie den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) oder den Insulin-Rezeptor aktiviert. Durch den aktiven Rezeptor wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zur Rekrutierung und Aktivierung der Ras-Proteine an der Zellmembran führt und eine Signalweiterleitung ermöglicht [13]. Ras-Proteine gehören zur Familie der kleinen monomeren G-Proteine und funktionieren als molekulare Schalter, wie in Abb. 1-3 gezeigt ist. Sie sind nur im Zustand mit gebundenen Guanosintri-phosphat (GTP) aktiv, während sie in inaktivem Zustand Guanosindiphosphat (GDP) gebunden haben. *Guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) katalysieren den Austausch des gebundenen GDP zu einem GTP. Der GEF *son of sevenless* ist dabei einer der am besten charakterisierten Ras-GEFs. Die Inaktivierung von Ras-Proteinen erfolgt durch eine intrinsische Hydrolyse des GTP zu einem GTP, die durch *GTPase activating proteins* (GAPs) verstärkt wird [13,14].

1. Einleitung

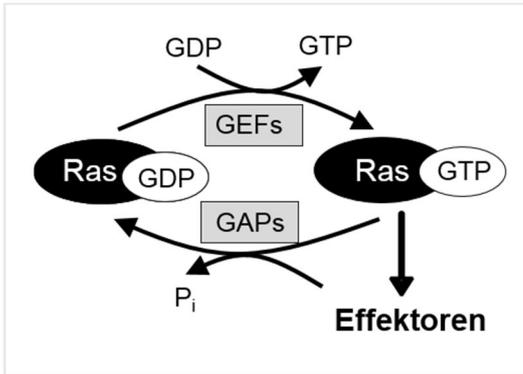


Abb. 1-3. Ras-Proteine sind molekulare Schalter. Ras liegt in inaktivem Zustand im Zytosol mit GDP gebunden vor. Das gebundene GDP wird nach Aktivierung der Signalkaskade durch GTP ausgetauscht, katalysiert durch GEFs. Inaktiviert wird Ras durch eine intrinsische Hydrolyse des GTP, katalysiert durch GAPs. Aktiviertes Ras interagiert mit verschiedensten Effektormolekülen und triggert Prozesse, wie Proliferation oder Zellzykluskontrolle. Modifiziert nach [10].

Ras kann verschiedene Signalwege durch die Interaktion mit verschiedenen Effektormolekülen aktivieren. Die Raf-Proteinkinasen (A-Raf, B-Raf und C-Raf) werden direkt durch Ras aktiviert und phosphorylieren die Kinasen MEK1/2, welche die MAP-Kinasen ERK1/2 phosphorylieren [12–14]. ERK1 und ERK2 können verschiedenste zytosolische oder nukleäre Substrate phosphorylieren, darunter z. B. die Myc-Transkriptionsfaktoren, welche entscheidend an der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt sind [12]. Weitere Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Inhibition der Apoptose werden ebenso durch aktivierte MAPK-Signalwege gefördert [12]. Ein weiterer identifizierter Ras-Effektor ist die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K) [15], welche die Akt-Kinasen phosphoryliert und eine Reihe von Prozessen, darunter Proliferation, Zellzyklus, Metabolismus und Überleben der Zelle reguliert [12,16].

1.4 Struktur und Funktion von Ras-Proteinen

Die Ras-Proteine sind in den Fokus der Krebsforschung gelangt, da sie mit ca. 30 % eine der häufigsten mutierten Onkogene in humanen Tumoren darstellen und deren Aktivierung die Tumorgenese bedeutend fördert [17–19]. Es existieren vier humane Ras-Isoformen, H-Ras, N-Ras und K-Ras mit den zwei *Splice*-Varianten K-Ras4A und K-Ras4B [20,21]. Mutationen im *KRAS*-Gen treten innerhalb aller Tumorarten mit einem Anteil von 22 % in besonders hoher Frequenz auf. In Pankreas-, Kolorektal- und Lungenkarzinomen ist häufig K-Ras4B mutiert, während in Melanomen vor allem N-Ras mutiert vorliegt [17,21]. Die häufigsten Ras-Mutationen treten in den hochkonservierten Regionen an Kodon 12, 13 und 61 auf und führen durch eine Inhibition der GAP-Bindung und der Hydrolyse von GTP zu einer konstitutiven Aktivität [17,21]. Dies triggert wiederum die Aktivität verschiedenster Signalwege, wie den MEK-ERK-Signalweg, aber auch die Hyperaktivität PI3-K/Akt-abhängiger Signalwege wird mit K-Ras-Mutationen in direkte Korrelation gebracht [22,23]. In verschiedenen Studien zur Funktion von onkogenem K-Ras wurde gezeigt, dass konstitutiv aktives K-Ras die Migration und Invasion fördert und Zell-Zell-Adhäsionen destabilisiert [24–27].

1. Einleitung

Da bisherige Ambitionen, mutiertes K-Ras über spezifische Inhibitoren direkt zu hemmen oder auch die Membranbindung zu verhindern scheiterten [28,29], rückten vor allem die nachgeschalteten Signaltransduktionsprozesse als *Drug Targets* in den Fokus der Forschung. In duktalem Pankreasadenokarzinomen (PDACs) konnten Akt-abhängige Signalwege mithilfe von Genomanalysen als eine der wichtigsten Mediatoren identifiziert werden, welche die Tumorprogression fördern [30,31]. Analysen in Pankreaskarzinomzelllinien – die im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. rer. nat. Monika Unger („Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras (G12V) auf die Signaltransduktion und Migration von PANC-1 Pankreaskarzinomzellen“, Universität Ulm 2006) erfolgten – ergaben, dass konstitutiv aktives K-Ras direkt mit der PI3-K interagiert und die nachfolgende Aktivierung von Akt1 und Akt2 essentiell für die Ausbildung eines motilen Phänotyps sind [32]. *In vivo* Studien von K-Ras-induzierten murinen Lungentumoren wiesen eine direkte Interaktion von K-Ras und der PI3-K nach und zeigten, dass die K-Ras-induzierte Tumorprogression von dieser Interaktion abhängig ist [33]. Die PI3-K/Akt-abhängige Signaltransduktion ist somit als einer der wichtigsten Effektor-Signalwege von onkogenem K-Ras einzustufen.

1. Einleitung

1.5 Der PI3-K/Akt-Signalweg in der Tumorgenese

1.5.1 Struktur der Akt-Kinasen

Die humanen Akt-Kinasen (auch bekannt als Protein Kinase B (PKB)) gehören zu der cAMP-abhängigen, cGMP-abhängigen und Protein Kinase C Familie der Proteinkinasen, die über 60 Proteine einschließt [16,34]. Es existieren drei humane Akt-Isoformen, Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) und Akt3 (PKB γ), welche durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Die Akt-Isoformen besitzen eine ca. 80 % homologe Struktur [35,36] und gleichen sich im Aufbau mit drei hochkonservierten Regionen (Abb. 1-4): die N-terminale *pleckstrin homology* (PH)-Domäne, eine Kinase-Domäne und eine C-terminale regulatorische Domäne mit einem hydrophoben Anteil [36]. Die Akt-Isoformen Akt1 und Akt2 werden ubiquitär in allen Geweben exprimiert, während Akt3 vor allem in neuronalen Gewebe, der Lunge und den Hoden exprimiert wird [37,35].

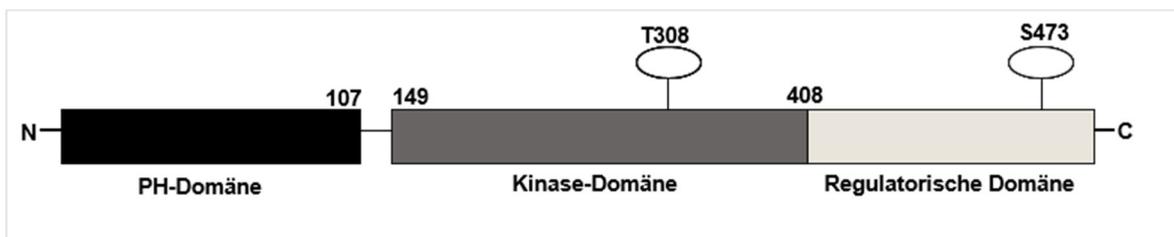


Abb. 1-4. Aufbau der Akt-Isoformen am Beispiel von Akt1. Die drei Akt-Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 sind im Aufbau stark konserviert und bestehen alle aus einer N-terminalen PH-Domäne, verbunden über eine *hinge*-Region mit der Kinase-Domäne und einer regulatorischen Domäne am C-Terminus. Die Phosphorylierungen der Aminosäurereste T308 und S473 sind essentiell für eine Aktivierung der Kinase-Aktivität.

Die Akt-Kinasen sind als einer der wichtigsten Signalmoleküle innerhalb der Zelle entscheidend an der Entwicklung von Tumoren beteiligt [12]. Dabei scheint vor allem die Hyperaktivierung sowie eine Überexpression der Akt-Kinasen und die Hyperaktivität nachgeschalteter Signalwege zur Tumorentwicklung beizutragen. Eine erhöhte Akt1-Kinase-Aktivität wurde in 40 % der Brust- und Ovarialkarzinome und in 50 % der Prostatakarzinome nachgewiesen, während eine erhöhte Akt2-Kinase-Aktivität in 25 % der primären Brustkarzinome ermittelt wurde [38]. *AKT2* wird in Pankreaskarzinomen im Vergleich zu normalen und benignen Pankreasgeweben stark überexprimiert und weist ebenso eine erhöhte Aktivität auf [38–42]. Die Überexpression von Akt2 konnte mit einer schlechten Prognose von PDACs korreliert werden [43]. Eine hohe Akt3-Kinase-Aktivität wird vor allem in Melanomen und in Brustkarzinomen sowie androgen-insensitiven Prostatakarzinomen detektiert [44–46].

1. Einleitung

Die Gründe für eine Hyperaktivität sind meist eine Genmutation, Amplifikation oder mRNA-Überexpression solcher Signalelemente, die die Akt-Aktivität regulieren [47]. Es kommen vor allem Amplifikationen oder Mutationen der Onkogene *PI3KCA* oder *RAS* als auch Verlust des Tumorsuppressorgens *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog*) oder Überexpression der Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z. B. des *EGFR*) vor [48,47]. Eine Mutation von *AKT* selbst spielt in Tumoren eher eine untergeordnete Rolle, lediglich eine Mutation von *AKT1* (E17K), die zu einer Hyperaktivität führt, konnte in verschiedenen Krebsarten in geringer Anzahl nachgewiesen werden [49].

1.5.2 Der PI3-K/Akt-Signalweg

Die Akt-Aktivierung erfolgt im kanonischen Signalweg durch eine Reihe von Signalproteinen (siehe Abb. 1-5). Zuerst wird durch extrazelluläre Stimuli (z. B. Wachstumsfaktoren), welche an RTK oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren binden, eine Aktivierung und Rekrutierung der Klasse 1 PI3-Kinasen zur Plasmamembran ausgelöst. Klasse 1 PI3-Kinasen hängen an Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat (PIP_2) eine 3'-OH-Gruppe an und Phosphatidyl-Inositol-Trisphosphat (PIP_3) wird produziert [36]. Weiterhin kann alternativ durch Mitglieder der Ras-Familie eine Aktivierung der PI3-K erfolgen [15]. Akt wird zu solchen Membranstellen rekrutiert, welche eine Akkumulation von PIP_3 aufweisen und bindet mit der PH-Domäne an PIP_3 . Auch weitere Proteine, die eine PH-Domäne aufweisen, wie die *phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1) werden hierdurch rekrutiert [47,50]. Akt verändert durch die Rekrutierung an die Membran die Konformation [51] und hierdurch wird die Phosphorylierung an einer Schlüsselstelle, an T308, durch die ebenfalls rekrutierte PDK1 ermöglicht. Die Stelle T308 liegt in der Aktivierungs-Schleife von Akt und wird im inaktiven Zustand durch eine intramolekulare Wechselwirkung der PH-Domäne mit der Kinase-Domäne verborgen gehalten [51]. Die Phosphorylierung an T308 führt zu einer um das 100-fach erhöhten Kinase-Aktivität, welche aber nicht die vollständig mögliche Aktivierung darstellt. Erst durch die Phosphorylierung des weiteren Aminosäurerestes S473, wird die vollständige Aktivität erreicht [52]. Die Phosphorylierung an Stelle S473 erfolgt durch Mitglieder der PI3-K-related kinase Superfamilie, entweder durch den Proteinkomplex *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) oder in Reaktion auf DNA-Schäden durch die *DNA-dependent proteinkinase* [53]. Diese zweite Phosphorylierung stabilisiert zum einen die Phosphorylierung an T308 und führt zum anderen zu einer vollständigen Kinase-Aktivität von Akt [52,54]. Im voll aktivierten Zustand dissoziiert Akt von der Plasmamembran und transloziert ins Zytosol oder den Zellkern. Akt phosphoryliert solche Substrate, die das Konsensus-Erkennungsmotiv R-X-R-X-X-S/T- Φ (X repräsentiert jede Aminosäure, Φ steht für solche Aminosäuren, welche lange hydrophobe Reste besitzen) aufweisen [50].

1. Einleitung

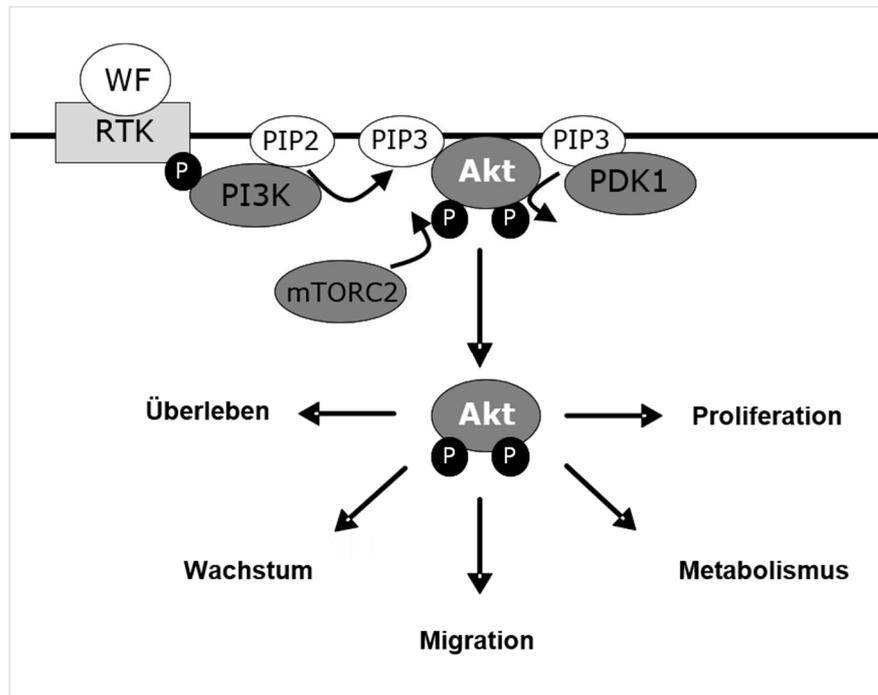


Abb. 1-5. Der PI3-K/Akt-Signalweg und die wichtigsten Funktionen. Im kanonischen Signalweg wird durch die Wachstumsfaktor (WF)-induzierte Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) oder G-Protein gekoppelten Rezeptoren die PI3-Kinase (PI3K) phosphoryliert (P). Diese setzt Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidyl-Inositol-Trisphosphat (PIP₃) um und Akt sowie die *phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1) werden an die Membran rekrutiert. Die PDK1 und *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) phosphorylieren Akt an den Schlüssel-Phosphorylierungsstellen T308 und S473. Akt-Kinasen regulieren durch die Phosphorylierung von spezifischen Substraten eine Vielzahl an Prozessen, wie Proliferation, Metabolismus und Migration. Modifiziert nach [55].

Es wurden bisher mehr als 100 Proteine, welche diese Sequenz besitzen, als Akt-Substrat identifiziert [50]. Neben dem spezifischen Erkennungsmotiv spielen für die Substrat-Phosphorylierung auch die Zugänglichkeit des Substrat-Phosphorylierungs-Motivs, die sekundäre Interaktion mit Akt und die subzelluläre Kompartimentalisierung von Akt und dem Substrat eine Rolle [50,55]. Ebenso kann Akt auch Substrate phosphorylieren, welche ein modifiziertes Erkennungsmotiv besitzen, wie die ATP-Citrat-Lyase, die statt des Arginin ein Prolin am 5'-Ende besitzt [56]. Durch die Vielzahl an Akt-Substraten, welche sowohl in der Regulation des Überlebens der Zelle, der Proliferation, des Wachstums, des Metabolismus als auch in der Kontrolle der Migration beteiligt sind, wird die zentrale Funktion der Akt-Kinasen in der Regulation von zellulären Prozessen deutlich [50,57]. Die Inaktivierung von Akt wird über die Dephosphorylierung an T308 und S473 durch die *protein phosphatase 2* (PP2A) und die *PH domain leucine-rich repeat phosphatase* induziert. Ebenso trägt das membrangebundene PTEN zu einer Inaktivierung von Akt durch die Hydrolyse von PIP₃ zu PIP₂ bei [16,50].

1. Einleitung

1.5.3 Wichtige Akt-Substrate und deren Funktion

Die Akt-Kinasen sind durch die Phosphorylierung spezifischer Substrate an der Kontrolle einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Einige wichtige Substrate und deren Funktionen werden im Folgenden erläutert.

In der Regulation des Metabolismus spielt z. B. die Phosphorylierung der Glykogen-Synthase-Kinasen- α und - β (GSK3 α/β) durch Akt an S21/S9 eine entscheidende Rolle. Die GSK3 α/β sind unter anderem für die Inhibition der Glykogen-Synthase verantwortlich, aber auch am Abbau des Zell-Zell-Adhäsionsproteins und Transkriptionsfaktors β -Catenin, der Inaktivierung des Zellzyklusproteins Cyclin D1 und des Transkriptionsfaktors c-Myc beteiligt. Die Akt-induzierte Phosphorylierung der GSK3 α/β inhibiert deren Aktivität. Dies resultiert in einer erhöhten Glykogensynthese, sowie in einer gesteigerten Zellzyklus-Progression und fördert insgesamt die Zellproliferation [34,47,50].

Den Akt-Kinasen wird eine positive Rolle in der Kontrolle des Zellwachstums, induziert durch Wachstumsfaktoren, wie z. B. durch den *epidermal growth factor* (EGF) oder den *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), zugeschrieben. Diese Rolle erfüllt Akt unter anderem durch die Aktivierung des Proteinkinase-Komplexes mTORC1. Der mTORC1 besteht aus der Proteinkinase mTOR, den Proteinen mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein/G β L (G-protein β -protein subunit-like)*) und Deptor (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) sowie Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) und PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*). Raptor dient als Gerüstprotein und PRAS40 inhibiert vermutlich als kompetitives Substrat die Aktivität des mTORC1. Aktives Akt phosphoryliert und inaktiviert den *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2), welcher als negativer Regulator des mTORC1 dient. Zusätzlich phosphoryliert Akt PRAS40 und hebt damit dessen inhibitorische Wirkung auf. Aktives mTOR phosphoryliert die p70S6-Kinase (p70S6K) und nachgeschaltet das ribosomale Protein S6. Auch wird der Translationsinitiationsfaktor *4E-binding protein 1* (4E-BP1) phosphoryliert und aktiviert. S6 und 4E-BP1 fördern durch die Aktivierung der Translation und der Ribosomen-Biogenese die Proteinsynthese, was wiederum die Zellproliferation positiv beeinflusst [47,50,58]. Zusätzlich wird durch aktives mTORC1 in einem *Feedback-Loop* die Akt-Phosphorylierung und Aktivität stabilisiert [59,60].

Abgesehen von der Regulation der Zellproliferation und des Metabolismus ist Akt auch entscheidend an der Regulation der Apoptose beteiligt. Akt aktiviert die E3-Ubiquitin-Ligase *mouse double minute homolog 2* (MDM2) im Zytosol durch Phosphorylierung an S166 [61]. Aktives MDM2 transloziert in den Zellkern und induziert die Polyubiquitylierung des Tumorsuppressors p53, was zu einer Proteasom-abhängigen Degradation von p53 führt. Dadurch kann der Zellzyklus ungehindert fortgesetzt werden [62].

1. Einleitung

Neben der Regulation von p53 wurden für MDM2 auch weitere Funktionen erkannt. In Brustkarzinomzelllinien konnte eine essentielle Rolle in der Regulation der Akt-regulierten Inhibition der Migration und Invasion durch die Degradation des pro-invasiven Transkriptionsfaktors *nuclear factor of activated T-cells 1* (NFAT1) für MDM2 ermittelt werden [63]. Zusätzlich reguliert Akt das Überleben der Zelle durch die Kontrolle der Aktivität zweier Transkriptionsfaktoren der *forkhead box O* (FoxO)-Familie, namentlich FoxO1 und FoxO3. Diese induzieren die Expression von Pro-Apoptose Genen und solchen Genen, die Differenzierung und Metabolismus steuern. Akt phosphoryliert nukleäres FoxO an den Stellen T32, S253 und S315. Dadurch wird dessen nukleärer Export und die Inaktivierung durch 14-3-3-Ankerproteine im Zytosol induziert [64].

Durch die Vielzahl an regulierten Substraten wird deutlich, dass Akt eine zentrale Rolle in der Regulation von zellulären Prozessen spielt und eine Hyperaktivierung Akt-abhängiger Signalwege die Proliferation, den Metabolismus, die Zellmigration und das Überleben der Zelle fördern kann.

1.5.4 Die Akt-Kinasen als *Drug-Target*

In der Therapie von Karzinomen wurden bereits einige Akt-Inhibitoren entwickelt, die in *in vitro* Studien gute Effekte erzielten, aber in klinischen Studien eine limitierte Wirksamkeit zeigten oder diese komplett verfehlten [50]. Als einer der Gründe für die limitierte Wirksamkeit ist die Entwicklung von Resistenzen zu nennen. In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass durch Akt-Inhibition eine Kreuzaktivierung des MEK-ERK-Signalweges erfolgen kann [65–67]. *Vice versa* kann auch eine Aktivierung des Akt-Signalweges nach Inhibition des MEK-ERK-Signalweges stattfinden [65,68]. Diese Kreuzaktivierung der beiden Signalwege kann zur Reaktivierung des eigentlich inhibierten Signalweges führen und somit eine Resistenz gegen die Behandlung hervorrufen. Studien in *non-small cell lung cancer* (NSCLC)-Zelllinien mit onkogener K-Ras-Mutation konnten nachweisen, dass die Kombination der Inhibition beider Signalwege zu einer erhöhten Effektivität der Behandlung führt [69,70]. So ist es von großem Interesse zu erkennen, ob die Inhibition einer der Signalkomponenten die Kreuzaktivierung eines anderen Signalweges auslöst und so zu einer Resistenz gegen die Behandlung führt, um dementsprechend eine Kombinationstherapie als weitere Behandlungsmöglichkeit zu erkennen. Weiterhin ist zu bedenken, dass jede Tumorart aufgrund der unterschiedlichen Mutationen und Hyperaktivitäten der wichtigen Signalwege vermutlich differentiell auf Inhibitoren reagiert. Deshalb sollten die basalen Signaltransduktionsprozesse jeweils im Detail studiert werden.

1.5.5 Die differentielle Funktion der Akt-Isoformen in Tumorzellen

Die Akt-Isoformen besitzen neben den redundanten Regulationsfunktionen auch spezifische physiologische Funktionen, was Studien in Mäusen mit einem homozygoten *knockout* von *Akt1*, *Akt2* oder *Akt3* belegen. *Akt1 knockout*-Mäuse zeigten ein verringertes Wachstum mit verringerter Organgröße, erhöhter Apoptoserate und erhöhter neonataler Mortalität [37,71,72]. Die Defizienz an *Akt2* führte zu einer Insulinresistenz sowie zu verzögertem Wachstum [73]; während *Akt3*-defiziente Mäuse eine verringerte Gehirngröße, verzögertes Wachstum und einen veränderten Glukose-Metabolismus zeigten [74,75]. Die funktionelle Spezifität lässt sich durch verschiedene Modelle der Regulation erklären: (1) Individuelle Verteilung der Akt-Isoformen in den Geweben, (2) differentielle Aktivierung der Akt-Isoformen durch extrazelluläre Stimuli, (3) unterschiedliche intrinsische katalytische Aktivität der Isoformen zur Phosphorylierung von Substraten und (4) subzelluläre Verteilung der Isoformen in den Zellkompartimenten, die eine Zugänglichkeit zu den Substraten erlaubt [38,55,76].

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die Akt-Isoformen essentiell an der Regulation der Migration und Invasion beteiligt sind und dabei, abhängig vom Ursprungsgewebe der untersuchten Zelllinie, unterschiedliche Funktionen einnehmen können. Die Übersicht in Abb. 1-6 zeigt die bisher bekannten isoformspezifischen Funktionen der Akt-Kinasen in der Migration von Tumorzellen und wird im Folgenden erläutert. In Brustkarzinomzelllinien konnte gezeigt werden, dass Akt1 die Migration durch die Degradation des Transkriptionsfaktors NFAT1 hemmt [63]. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass MDM2 für die Ubiquitylierung von NFAT1 verantwortlich ist. Eine Inhibition von MDM2 führte in dieser Zelllinien zu einer erhöhten Migrationsrate [63]. Weiterhin wirkt Akt1 auch durch die Phosphorylierung von TSC2 [77], durch die Inhibition der ERK-Aktivität und die direkte Phosphorylierung des Aktin-Zytoskelett Proteins Palladin anti-migratorisch [78]. Aktives Palladin ist als wichtiger Reorganisator des Aktin-Zytoskeletts an der Regulation der Zellmotilität beteiligt und konnte als exklusives Akt1-Substrat identifiziert werden [78]. In verschiedenen NSCLC-Zelllinien mit *KRAS*- oder *EGFR*-Mutation führte der *knockdown* von Akt1 zu einer erhöhten Migrationsrate [79]. Dies konnte auch in einer Studie mit epithelialen Brustkarzinomzellen bestätigt werden [80]. In Fibroblasten und endothelialen Zellen hingegen wurde durch Zhou *et al.* [81] und Meng *et al.* [82] gezeigt, dass Akt1 einen pro-migratorischen Effekt hat. Es konnte in Fibroblasten die direkte Phosphorylierung des Aktin-Zytoskelett interagierenden Proteins Girdin durch Akt1 zur Bildung von Aktin-Stressfasern und Lamellipodien gezeigt werden [83]. Weiterhin zeigte sich auch in verschiedenen Krebszellarten, darunter in Ovarialkarzinomen [84] und Brustkarzinomen [85], dass Akt1

1. Einleitung

einen pro-migratorischen und pro-invasiven Effekt haben kann, was wiederum die Abhängigkeit der Funktion vom Zelltyp belegt.

Für Akt2 scheint es eine gegensätzliche Rolle in der Migration von epithelialen Karzinomzellen zu geben. In Studien von Arboleda *et al.* und Dillon *et al.* wurde nachgewiesen, dass Akt2 die Motilität und Invasivität durch die Hochregulation von β 1-Integrinen fördert [86,87]. Diese Zell-Matrix-verbindenden Adhäsionsmoleküle sind essentiell, um fokale Kontakte auszubilden, und somit für die Protrusion und neuen Verankerung motiler Zellen relevant. Weiterhin fördert Akt2 die Stabilisierung der Palladin mRNA und dadurch auch die Expression dieses Proteins, was wiederum zur Ausbildung eines motilen Phänotyps beiträgt [88]. Studien in Ovarial- und Prostatakarzinomzelllinien zeigten für Akt2 eine pro-migratorische und pro-invasive Rolle [80,89]; auch für Kolonkarzinomzellen wurde eine erhöhte Invasivität durch Akt2 gezeigt [90]. Dass Akt2 auch eine wichtige Rolle in der Zellproliferation spielt, zeigte die simultane Inhibition von onkogenem K-Ras und Akt2 in Pankreastumoren, welche in einer stark gehemmten Proliferation resultierte [91]. In *Akt2*-defizienten Mäusen wurde auch ein stark vermindertes Tumorwachstum detektiert [92] sowie auch in der Lungenkarzinomzelllinie LNM35 Akt2 für die Proliferation als essentiell beschrieben wird [93]. Neben Migration und Invasion kontrolliert Akt2 somit auch die Zellproliferation und das Tumorwachstum in Krebszellen epithelialen Ursprungs. In mesenchymalen Stammzellen konnte auch eine pro-migratorische und pro-invasive Funktion für Akt2 nachgewiesen werden [94].

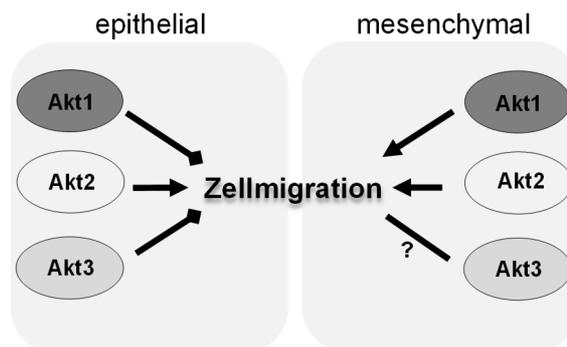


Abb. 1-6. Die Akt-Isoformen regulieren die Zellmigration in Abhängigkeit vom Zelltyp. In epithelialen Tumorzellen konnte eine anti-migratorische (—◆) Funktion von Akt1 nachgewiesen werden, während Akt2 sich pro-migratorisch (—→) auswirkt. Diese Funktion zeigt Akt2 auch in mesenchymalen Stammzellen. Akt1 hingegen wirkt sich hemmend auf die Migration aus. Für Akt3 konnte in epithelialen Karzinomzellen vor allem eine anti-migratorische Rolle gezeigt werden. In mesenchymalen Zellen ist die Funktion von Akt3 in der Zellmigration nicht bekannt. Modifiziert nach [55].

1. Einleitung

Die Rolle von Akt3 in der Regulation von zellulären Prozessen wurde aufgrund der geringen Expressionsrate in vielen Tumorgeweben bisher nur in geringem Umfang studiert. Aufgrund einer festgestellten Akt3-Überexpression und -Hyperaktivität in fortgeschrittenen Melanomen ist die Funktion von Akt3 in dieser Krebsart am besten untersucht. In verschiedenen Studien in Melanomen wurde eine prädominante Rolle von Akt3 in der Kontrolle des Tumorstadiums, Überlebens und der Metastasierung gezeigt [45,95]. In ersten Studien zur Rolle von Akt3 in Brustkarzinomzelllinien (*triple-negative ERBB receptor cancer cells*, TNBCs) führte der *knockdown* von Akt3 zu einem verminderten Zellwachstum durch die Hochregulation von p27, einem Zellzyklus-Inhibitor [96]. Grottke *et al.* konnten zeigen, dass in TNBCs der gemeinsame *knockdown* von Akt2 und Akt3 sowie der alleinige *knockdown* von Akt3 die Migration induziert und wiesen hiermit eine überlappende Rolle der beiden Akt-Isoformen in der Migration nach [97]. In Studien von Chin und Toker [96] wurde nach Akt3-Depletion ebenso eine leicht erhöhte Zellmigration von verschiedenen TNBCs nachgewiesen. Neben dem Einfluss von Akt3 auf die Migration konnten in einer Blasen- und einer Lungenkarzinomzelllinie auch weitere wichtige zelluläre Prozesse mit Akt3 in Verbindung gebracht werden. Hier wurde eine mitochondriale Dysfunktion und verminderte Proliferation nach Akt3-Depletion festgestellt [98]. In Zellen mesenchymalen Ursprungs ist die Funktion von Akt3 in der Migration bisher nicht untersucht.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der PI3-K/Akt-Signalweg konnte in Arbeiten der Arbeitsgruppe als wichtiger Effektor-Signalweg von stabil überexprimiertem, onkogenem K-Ras(V12) in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 identifiziert werden [32]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die PI3-K und die Kinasen Akt1 und Akt2 essentiell für die K-Ras-induzierte Motilität sind [32]. Aufbauend auf diesen Ergebnissen war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Beitrag und die molekularen Mechanismen der K-Ras/Akt-regulierten Motilität sowie von Akt-Effektoren in der Migration von Karzinomzelllinien mit onkogenem K-Ras zu analysieren.

Zunächst sollte dazu eine Analyse der Expression und Aktivität der Akt-Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 in PANC-1-Zellklonen mit stabiler Expression von EGFP-K-Ras(V12) erfolgen. Anschließend sollten diese Analysen ebenso in etablierten Pankreas- und Lungenkarzinomzellen durchgeführt werden. Zur Analyse der Bedeutung PI3-K/Akt-abhängiger Signalwege in der Migration sollten Akt-induzierte Signalwege durch die Verwendung verschiedener Wachstumsfaktoren und pharmakologischer Substanzen zuerst näher charakterisiert und Akt-Effektoren, die eine Funktion in der Motilität haben könnten, identifiziert werden.

Um die Bedeutung der Akt-Kinasen, sowie der einzelnen Akt-Isoformen und von identifizierten Akt-Effektoren in der Migration grundlegend zu analysieren, sollten *Wounding-Assays* durchgeführt werden. Es sollten verschiedene pharmakologische Substanzen zur Inhibition der PI3-K, der Akt-Kinasen und einiger Akt-Effektoren verwendet sowie darüber hinaus siRNA-vermittelte Depletionen zur spezifischen Inhibition der Akt-Isoformen durchgeführt werden.

Da im Prozess der Migration vor allen Dingen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts Voraussetzung zur Fortbewegung sind, sollten Akt-abhängige Effekte auf das Zytoskelett mithilfe von Lebendzell-Färbungen und immunhistochemischen Verfahren untersucht werden.

2. Material

2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
2 % (m/V) Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel B)	Roth, Karlsruhe
30 % (m/V) Acrylamid (Rotiphorese® Gel A)	Roth, Karlsruhe
4-Nitroblau Tetrazolium Chlorid (NBT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Adenosine 5'-triphosphate disodium salt</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Peqlab-Life Science, Erlangen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua-Stabil	Th-Geyer, Renningen
<i>Bovine pituitary extract</i>	Life Technologies, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA), pH 7.0	Serva GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue R 250	Merck Millipore, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Zellkultur	AppliChem, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
<i>Dulbecco's-Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Essigsäure (100 %, glazial)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (<i>molecular biology grade</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Fötales Bovines Serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Genitacin 418-Sulfat (G418)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
GlutaMAX™ (200 mM L-alanyl-L-Glutamin)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Glyzerin (<i>molecular biology grade</i>)	VWR, Darmstadt
Glyzin	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Immobilon™ <i>Western Chemiluminescent HRP Substrate</i>	Merck Millipore, Darmstadt
Isobutanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck Millipore, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Millipore, Darmstadt
<i>Keratinocyte serum-free medium</i>	Life Technologies, Darmstadt

2. Material

Kupfer(II)-Sulfat	Riedel-de Haen, Seelze
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
MEM <i>Non-essential amino acids solution</i> (100x)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Midori Green <i>Advance</i>	Nippon Genetics Europe, Düren
Milchpulver, <i>Blotting Grade</i>	Roth, Karlsruhe
Mitomycin-C	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Mowiol 4-88	Merck Millipore, Darmstadt
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Merck Millipore, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS), <i>Blotting-Grade</i>	AppliChem, Darmstadt
Natriumfluorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet P-40 (NP-40)	Roche, Mannheim
Opti-MEM® <i>Reduced Serum Medium</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pefabloc	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pierce® <i>BCA Protein Assay Reagent A</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)-Medium 1640	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Salzsäure 37 % (m/V)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SuperSignal™ <i>West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Tetra-Natriumpyrophosphat Decahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trichloressigsäure (TCA)	AppliChem, Darmstadt
Tris, <i>ultrapure</i>	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100 (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (0.05 %) Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween® 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Glycerophosphat	Fluka Biochemica, München

2. Material

2.2 Enzymsubstrate

BezeichnungGSK-3 α / β -FusionsproteinGSK-3 α -GST-Fusionsprotein**Hersteller, Bestellnummer**Cell Signaling Technology, Frankfurt,
#9237L

PromoKine, Heidelberg, #PK-CA577-7003

2.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung

6-Lochzellkulturplatten

12-Lochzellkulturplatten

Amersham® Protran 0.45 *Nitrocellulose*
*Transfer Membrane*Deckglaskammern, *LabTek® Chamber slide™*
System, 2 chamber

Deckglas

Filterspitzen (1000 μ l, 200 μ l)Filterspitzen (10 μ l)

Kanülen 21 G (0.9 x 40 mm)

Kanülen 25 G (0.5 x 25 mm)

Kryoröhrchen 2 ml, Nunc™

Messpipetten (10 ml, 5 ml, 2 ml)

Messpipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml)

Millex-GS Sterilfilter (0.22 μ m)

Objektträger

Steritop-GP 150 ml Express Plus Sterilfilter
(0.22 μ m)

Pasteurpipetten

Pipettenspitzen (1000 μ l)Pipettenspitzen (200 μ l, 20 μ l, 10 μ l)

Polypropylenröhrchen (15 ml)

Polypropylenröhrchen (50 ml)

Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)

Reaktionsgefäße, *Safe-Lock* (1.5 ml, 2 ml)

Tuberkulin-Spritzen (1 ml) Omnifix®-F

Whatman®-Papier

Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm)

Zellschaber (16 cm, 30 cm)

Hersteller

Sarstedt, Nümbrecht

Sarstedt, Nümbrecht

GE Healthcare, Freiburg

Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Menzel-Gläser, Langenselbold

Nerbe plus, Winsen

Biozym, Hess.Oldendorf

Becton Dickinson, Heidelberg

Becton Dickinson, Heidelberg

Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

NeoLab Migge, Heidelberg

Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Merck Millipore, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Merck Millipore, Darmstadt

Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sarstedt, Nümbrecht

Sarstedt, Nümbrecht

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sarstedt, Nümbrecht

Eppendorf, Hamburg

B. Braun Melsungen AG, Melsungen

GE Healthcare, Freiburg

Sarstedt, Nümbrecht

Sarstedt, Nümbrecht

2. Material

2.4 Zelllinien

2.4.1 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 2-1. Verwendete humane Zelllinien und deren Eigenschaften sowie Referenzen aus den Datenbanken ATCC®, DSMZ und ECACC. NSCLC = *Non-small cell lung cancer*, SCLC = *Small cell lung cancer*.

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Tumortyp	ATCC®, DSMZ-, ECACC-Nr.
A-427	Lunge	Karzinom	HTB-53
A549	Lunge	Karzinom	CCL-185™
COLO-699	Lunge; Metastase (Pleuraerguss)	Adenokarzinom	ACC 196
H1299	Lunge; Metastase (Lymphknoten)	Karzinom; NSCLC	CRL-5803™
H1688	Lunge; Metastase (Leber)	Karzinom; SCLC	CCL-257™
H23	Lunge; Metastase (Pleuraerguss)	Adenokarzinom; NSCLC	CRL-5800™
H2122	Lunge	Adenokarzinom; NSCLC	CRL-5985™
H358	Lunge; Metastase (Alveole)	Bronchoalveolarkarzinom; NSCLC	CRL 5807
HCC-44	Lunge	Adenokarzinom	ACC 534
HTB-55	Lunge; Metastase (Pleuraerguss)	Adenokarzinom	HTB-55
AsPC-1	Pankreas; Metastase (Aszites)	Adenokarzinom	CRL-1682™
BxPc-3	Pankreas	Adenokarzinom	CRL 1687™
Capan-1	Pankreas; Metastase (Leber)	Adenokarzinom	ACC 244
Capan-2	Pankreas	Adenokarzinom	ACC 245
COLO 357	Pankreas; Metastase (Lymphknoten)	Adenokarzinom	94072245
H6c7	Pankreas	-	-
MIA PaCa-2	Pankreas	Adenokarzinom	CRL-1420™
PANC-1	Pankreas	Adenokarzinom	CRL-1469™
PaTu 8902	Pankreas	Adenokarzinom	ACC 179
PaTu 8988s	Pankreas; Metastase (Leber)	Adenokarzinom	ACC 204
PaTu 8988t	Pankreas; Metastase (Leber)	Adenokarzinom	ACC 162

2.4.2 Stabil-exprimierende Zellklone

Stabil exprimierende Zellklone

PANC-1/EGFP-14

PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.1

PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.4

PANC-1/EGFP-K-Ras(N17)-5x

Vektor

pEGFP-C3

pEGFP-C3/K-Ras (G12V)

pEGFP-C3/K-Ras (G12V)

pEGFP-C3/K-Ras (S17N)

Die verwendeten, stabil exprimierenden Zellklone wurden von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl hergestellt [24,25].

2. Material

2.5 Antikörper

2.5.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2-2. Übersicht der verwendeten Primär-Antikörper: NC = Nitrocellulose, mk = monoklonal, pk = polyklonal, IB = Immunblot, ICH = Immunhistochemie, (1) = 5 % MP in TBS + 0.1 % Tween20® (TBS/T), (2) = 3% BSA in TBS/T, (3) = 0.3 % BSA in TBS/T, (4) = TBS, kDa = Kilodalton, * Molekulargewicht des Proteins laut UniProt-Datenbank.

Antigen	Verdünnung IB/IHC	Blocken der NC-Membran	Aus Spezies	Hersteller & Bestellnr.	Größe der Proteine (kDa)*
Akt1,2,3 (pan) (40D4)	1:2000 in (2)	(1)	Maus (mk)	Cell Signaling, #2920	55.7 (Akt1); 55.8 (Akt2, Akt3)
Akt1 (2H10)	1:2000 in (1)	(1)	Maus (mk)	Cell Signaling, #2967	55.7
Akt2 (L79B2)	1:1000 in (1)	(1)	Maus (mk)	Cell Signaling, #5239	55.8
Akt2 (D6G4)	1:2000 in (2)	(1)	Kaninchen (mk)	Cell Signaling, #3063	55.8
Akt3 (L47B1)	1:1000 in (1)	(1)	Maus(mk)	Cell Signaling, #8018	55.8
Akt3 (GMA104)	1:1000 in (1)	(1)	Maus (mk)	Millipore, #05-780	55.8
Beta-Aktin (AC-15)	1:4000 in (2)	(1)	Maus (mk)	Sigma-Aldrich, #A5441	42
Cadherin-E	1:4000 in (1)	(1)	Maus (mk)	BD, #610182	98
Catenin-β	1:2000 in (1)	(1)	Maus (mk)	BD, #610154	86
ERK (pan)	1:2000 in (2)	(1)	Maus (mk)	BD, #610123	43 (ERK1); 42 (ERK2)
ERK1/2 (L34F12)	1:2000 in (2)	(1)	Maus (mk)	Cell Signaling, #4696	43 (ERK1); 42 (ERK2)
FoxO3a (75D8)	1:1000 in (2)	(1)	Kaninchen (pk)	Cell Signaling, #2497	71
GAPDH	1:5000 in (4)	(1)	Kaninchen (pk)	Santa Cruz, #sc-25778	36
GFP	1:750 in (4)	(1)	Kaninchen (pk)	Santa Cruz, #sc-8334	27
GFP	1:2000 in (4)	(1)	Kaninchen (pk)	Cell Signaling, #2555	27
Girdin	1:1000 in (1)	(2)	Kaninchen (pk)	Santa Cruz, #sc-133371	216
GSK3β (3D10)	1:1000 in (1)	(1)	Maus (mk)	Cell Signaling, #9832	47
MDM2 (3G9)	1:1000 in (2)	(2)	Maus (mk)	Millipore, #04-1530	55
p38α	1:1000 in (2)	(1)	Maus (mk)	BD, #P91830	41
p53 (D01)	1:50 in (4)	(1)	Maus (mk)	Hybridoma-überstand	44

2. Material

Antigen	Verdünnung IB/IHC	Blocken der NC- Membran	Aus Spezies	Hersteller & Bestellnr.	Größe der Proteine (kDa)*
p70S6 Kinase (49D7)	1:1000 in (2)	(1)	Kaninchen (pk)	Cell Signaling, #2708	59
Phospho-Akt (S473) (D9E) XP®	1:1000 in (2)	(1)	Kaninchen (mk)	Cell Signaling, #4060	55.7
Phospho-Akt (S473)	1:1000 in (2)	(1)	Kaninchen (pk)	Cell Signaling, #9271S	55.7
Phospho-Akt (T308)	1:1000 in (2)	(1)	Kaninchen (pk)	Cell Signaling, #9275S	55.7
Phospho- FoxO1(T24)/ FoxO3a (T32)	1:500 in (2)	(1)	Kaninchen (pk)	Cell Signaling, #9464	70 (FoxO1); 71 (FoxO3)
Phospho- GSK3α/β(S21/9; α preferred) (37F11)	1.1000 in (2)	(1)	Kaninchen (pk)	Cell Signaling, #9331	51 (GSK3α); 47 (GSK3β)
Phospho- GSK3α/β(S21/9)	1:1000 in (2)	(1)	Kaninchen (mk)	Cell Signaling, #3927	51 (GSK3α); 47 (GSK3β)
Phospho-MDM2 (S166)	1 :1000 in (2)	(2)	Kaninchen (mk)	Cell Signaling, #3521S	55
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (T202/Y204)	1:2000 in (2)	(1)	Kaninchen (mk)	Cell Signaling, #4370	43 (ERK1); 42 (ERK2)
Phospho-p38 MAPK (T180/Y182)	1:1000 in (2)	(1)	Kaninchen (pk)	Cell Signaling, #9211S	41
Phospho- p70S6K(T389) (108D2)	1:1000 in (2)	(1)	Kaninchen (pk)	Cell Signaling, #9234	59
Phospho-S6 <i>ribosomal protein</i> (S235/236)	1:2000 in (2)	(1)	Kaninchen (pk)	Cell Signaling, #2211	29
<i>S6 ribosomal protein</i> (54D2)	1:1000 in (2)	(1)	Maus (mk)	Cell Signaling, #2317	29
Vimentin (V9)	1:1000 in (2)	(1)	Maus (mk)	Sigma- Aldrich, #V6630	54
(α-)Tubulin	1:5000 in (2)/ 1:500 in (3)	(1)	Maus (mk)	Sigma- Aldrich, #T5168	50

2. Material

2.5.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2-3. Übersicht der sekundären Antikörper für Immunfluoreszenz: Alle Antikörper wurden in TBS verdünnt. HRP = *horseradish peroxidase*, AP = Alkalische Phosphatase.

Antikörper	Verdünnung	Aus Spezies	Hersteller, Bestellnummer
Anti-Maus IgG (H+L)-CF®680	1:300.0000	Ziege	Biotrend, Köln, #20065
Anti-Maus IgG (H+L)-CF®770	1:150.0000	Ziege	Biotrend, Köln, #20077
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-CF®680	1:150.0000	Ziege	Biotrend, Köln, #20067
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-CF®770	1:150.0000	Ziege	Biotrend, Köln, #20078
Anti-Maus IgG, <i>HRP-linked</i>	1:5000	Pferd	New England Biolabs, Frankfurt, #7076
Anti-Kaninchen IgG, <i>HRP-linked</i>	1:5000	Ziege	New England Biolabs, Frankfurt, #7074
Anti-Maus IgG, HRP TrueBlot® ULTRA	1:5000	Ratte	Biomol, Hamburg, #18-8817-33
Anti-Maus IgG, <i>AP-linked</i>	1:5000	Ziege	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, #A-3562
Anti-Kaninchen IgG, <i>AP-linked</i>	1:5000	Maus	Jackson/Dianova, Hamburg, #211-055-109

Tabelle 2-4. Übersicht der sekundären Antikörper und Farbstoffe für Immunhistochemie und Lebendzellfärbung: (1) = 0.3 % BSA/TBST, (2) = DMEM.

Antikörper/Farbstoff	Verdünnung	Hersteller, Bestellnummer
Ziege Anti-Maus-Alexa488	1:1000 in (1)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, #A-11001
Phalloidin-TexasRed	1:300 in (1)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, #T-7471
SiR-Actin	1:500-1:1000 in (2)	Tebu bio GmbH, Offenbach am Main, #SC001
DAPI	1:10.000 in (1)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, #D-9564

Tabelle 2-5. Antikörper für Immunpräzipitation. mk = monoklonal.

Antigen/Antikörper	Aus Spezies	Konzentration	Hersteller, Bestellnummer
Akt1 (2H10)	Maus (mk)	1.67 µg/µl	Cell Signaling, Frankfurt am Main, #2967
Akt2 (L79B2)	Maus (mk)	1.5 µg/µl	Cell Signaling, Frankfurt am Main, #5239
Akt3 (GMA104)	Maus (mk)	1 µg/µl	Merck Millipore, Darmstadt, #05-780
IgG2a	Maus (mk)	100 µg/ml	DAKO, Hamburg, #X0943

2. Material

2.6 Wachstumsfaktoren und pharmakologische Substanzen

Tabelle 2-6. Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktor	(1) Lösungsmittel (2) eingesetzte Konzentration	Hersteller, Bestellnummer
<i>Epidermal growth factor</i> (EGF)	(1) ddH ₂ O (2) 10 ng/ml-30 ng/ml	PeproTech Inc., Hamburg, #AF-100-15
<i>Fibroblast-like growth factor-2</i> (FGF-2)	(1) 10 mM Tris pH 7.6 (2) 10 ng/ml	Tebu bio GmbH, Offenbach am Main, #100-18B
<i>Hepatocyte growth factor</i> (HGF)	(1) PBS + 0.1 % BSA (2) 10 ng/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, #H-1404
<i>Insulin-like growth factor-1</i> (IGF-1)	(1) ddH ₂ O (2) 10 ng/ml	PeproTech Inc., Hamburg, #100-11
<i>Platelet derived growth factor-AA</i> (PDGF-AA)	(1) 4 mM HCl + 0.1 % BSA (2) 10 ng/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, #P-3076

Tabelle 2-7. Pharmakologische Substanzen

Substanz	Ziel	(1) Lösungsmittel (2) eingesetzte Konzentration	Hersteller, Bestellnummer
AktVIII-Inhibitor	Akt1/2/3-Inhibitor	(1) DMSO (2) 5 µM; 10 µM	Merck Chemicals, Schwalbach, #124018-1MG
LY294002	PI3-K-Inhibitor	(1) DMSO (2) 10 µM	Alexis Biochemicals, Grünberg, #270-038-M005
Nutlin-3, Racemic	MDM2-Inhibitor	(1) DMSO (2) 10 µM	Merck Chemicals, Darmstadt, #444143
PD98059	MEK1-Inhibitor	(1) DMSO (2) 25 µM	New England Biolabs, Frankfurt, #9900
Pifithrin-α	p53-Inhibitor	(1) DMSO (2) 10 µM; 25 µM	Enzo Life Sciences, Lörrach, #BML-GR325-0005
Rapamycin	mTOR-Inhibitor	(1) Methanol (2) 100 nM	Alexis Biochemicals, Grünberg, #390-004-C100
SC-79	Akt1/2/3-Aktivator	(1) DMSO (2) 1-100 µM	Merck Chemicals, Schwalbach, #123871-25MG
UO-126	MEK1/2-Inhibitor	(1) DMSO (2) 1 µM; 10 µM	Merck Millipore, Darmstadt, #662005

2. Material

2.7 siRNA-Sequenzen

Tabelle 2-8. siRNA-Sequenzen

siRNA-Bezeichnung	Ziel-Sequenz	Hersteller; Bestellnummer
SmartPool siAkt1:		Dharmacon, München, #L-003-000-00-0005
SmartPool siAkt1-10	CAUCACACCACCUGACCA	
SmartPool siAkt1-11	ACAAGGACGGGCACAUUAA	
SmartPool siAkt1-12	CAAGGGCACUUUCGGCAAG	
SmartPool siAkt1-13	UCACAGCCCUGAAGUACUC	
SmartPool siAkt2:		Dharmacon, München, #L-003-001-00-0005
SmartPool siAkt2-09	ACACAAGGUACUUCGAUGA	
SmartPool siAkt2-10	GCAAGGCACGGGCUAAAGU	
SmartPool siAkt2-11	GUGAAUACAUCAAGACCUG	
SmartPool siAkt2-12	CAUGAAUGACUUCGACUAU	
SmartPool siAkt3:		Dharmacon, München, #L-003-002-00-0005
SmartPool siAkt3-13	GCACACACUCUAACUGAAA	
SmartPool siAkt3-14	GAAGAGGGGAGAAUUAUA	
SmartPool siAkt3-15	GUACCGUGAUCUCAAGUUG	
SmartPool siAkt3-16	GACAGAUGGCUCAUUCAUA	
SmartPool siScrambled (non-targeting pool):		Dharmacon, München, #D-01810-10-20
	UGGUUUACAUGUCGACUAA	
	UGGUUUACAUGUUGUGUGA	
	UGGUUUACAUGUUUUCUGA	
	UGGUUUACAUGUUUUCUA	

2.8 qPCR-Primer

Tabelle 2-9: Übersicht der verwendeten Primer. Angegeben sind die Orientierung der Primer: S = sense, AS = antisense und die Sequenz, die Transkriptlänge (TK) sowie die GeneBank Accession Nummer (GBA) der analysierten Gene aus der NCBI-Datenbank. Weiterhin ist die *Annealing*-Temperatur (*Annealing*-Temp.), die in der PCR verwendet wurde, aufgeführt.

Primer	Orien- tierung	Sequenz (5'-3')	Bindungs- bereich im <i>Template</i> (bp)	TK (nt)	GBA-Nr.	<i>Annealing</i> - Temp.
Akt1	S	GCTGACGGCCTC AAGAAGCA	873-892	173	NM_001014432	64 °C
	AS	ACCTTGCCGAAA GTGCCCTT	1045-1026			
Akt2	S	CCGCCTGTGCTT TGTGATGG	968-987	170	NM_001626	64 °C
	AS	TTTCCAGCTTGA TGTCGCGG	1137-1118			
Akt3	S	ACAGATGGCTCA TTCATAGG	203-222	196	NM_005465	58 °C
	AS	CCCTTTCCTCTG GAGTATCT	398-397			
RPLP0	S	GTCGGAGGAGTC GGACGAG	1086-1104	102	NM_001002	58 °C/64 °C
	AS	GCCTTTATTTCC TTGTTTGTCAAA	1170-1187			
β-Aktin	S	GACTACCTCATG AAGATCCT	643-662	312	NM_001101	60 °C
	AS	GCGGATGTCCAC GTCACACT	935-954			

2. Material

2.9 Molekularbiologische Reagenzien

2.9.1 Marker

Tabelle 2-10: Marker

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller, Bestellnummer
1 kb DNA Ladder N3232	Agarose-Gelelektrophorese	New England Biolabs, Frankfurt am Main, # N3232
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	SDS-PAGE	Life Technologies GmbH, Darmstadt, #26616
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standard	SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, #1610375

Größen der enthaltenen DNA-Fragmente (1 kb DNA Ladder N3232): 10.002 bp, 8001 bp, 6001 bp, 5001 bp, 4001 bp, 3001 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 517 bp, 500 bp

Größen der enthaltenen gefärbten Proteine (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder): 180 kDa, 150 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 17 kDa, 10 kDa

Größen der enthaltenen gefärbten Proteine (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standard): 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa

2.9.2 Transfektionsreagenzien

Tabelle 2-11: Übersicht der Transfektionsreagenzien

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
DharmaFECT 1	Dharmacon, München, #T2001-03
DMRIE-C	Life Technologies GmbH, Darmstadt, #10459014

2.9.3 Molekularbiologische Kits

Tabelle 2-12: Übersicht der molekularbiologischen Kits

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden, #74134
SuperScript™ II RT Kit	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, #18064014
SYBR® Green PCR Mix 2x	Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, #4309155
FastGene® Taq Ready Mix	Nippon Genetics Europe, Düren, #LS27

2. Material

2.10 Geräte

Tabelle 2-13: Geräteliste

Bezeichnung	Hersteller
Absorptionsreader für Mikroplatten ELx800™	Biotek, Bad Friedrichshall
Blockthermostat VWR® <i>Analog heatblock 2BLK</i>	VWR International GmbH, Darmstadt
CO ₂ -Inkubator HERAcCell 150i	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Cryo1°C Freezing Container Mr. Frosty™ 5100, Nalgene®	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
<i>Electrophoresis Power Supply Power Pac 300</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenz-Lichtquelle X-Cite® 120PC Q	Olympus, Hamburg
Fusion SL4-3500.WL <i>Chemiluminescent Imaging System</i>	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
Horizontale Elektrophoresekammer	Micro-Bio-Tec-Brand, Giessen
Inverses Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81	Olympus, Hamburg
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Inverses Lichtmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss, Oberkochen
JuLi™ Smart Fluorescent Cell Analyzer 10x	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Kühlzentrifuge Heraeus® Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Magnetrührer IKA®-Combimag-RCH	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Odyssey® SA <i>near-infrared Imaging System</i>	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
pH Meter FiveEasy	Mettler Toledo, Giessen
Pipetten Pipetman Classic™ (P1000, P200, P20, P10)	Gilson International, Limburg
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
QPCR System Mx3005P	Agilent Tech., Waldbronn
Rotator für Reaktionsgefäße	VWR International GmbH, Darmstadt
Schüttler Elmi Shaker DRS-12	Miliot Science, Porvoo, Finnland
Sicherheitslaborbrenner Fuego SCS basic	WLD-Tec, Göttingen
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage Type 1.2	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Sonifikationsbad <i>Transsonic 310</i>	Elma Schmidbauer GmbH, Singen
Tankblotkammer Mini-Blot System CBS-Scientific EBU 204 (L x H x B; 14 x 13 x 16 cm)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Thermomixer® compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415-R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge CompactStar CS 4	VWR International GmbH, Darmstadt
UV-Transilluminator GeneFlash	Syngene Bio Imaging/Alpha Metrix Biotech GmbH, Rödermark
Vakuumpumpe <i>Vacusafe</i>	Integra Biosciences, Fernwald
Vertikal-Elektrophoresekammer Mini-Gel System CBS Scientific MGV 402 (Gele 5 x 8 cm)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vertikal-Elektrophoresekammer für Multigele Type G44 (Gele 12 x 7 cm)	Biometra, Göttingen
Wippe Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach

2. Material

2.11 Software

Tabelle 2-14: Software-Liste

Bezeichnung	Hersteller
AnalySIS Version 3.2	EMSIS GmbH, Münster
CellSens™ Dimension	Olympus, Hamburg
Fiji <i>OpenSource</i> Software	<i>Fiji: an open-source platform for biological-image analysis</i> Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. <i>Nature methods</i> . 2012
Fusion Version 15.18	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gen5 Version 2.0	Biotek, Bad Friedrichshall
GraphPad Prism® Version 5.0	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
GProX <i>OpenSource</i> Software Version 1.1.13	<i>GProX, a User-Friendly Platform for Bioinformatics Analysis and Visualization of Quantitative Proteomics Data</i> Rigbolt KT, Vanselow JT, Blagoev B <i>Mol Cell Proteomics</i> . 2011
ImageStudio™ Version 5.2	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
JuLi™ FL <i>Smart Fluorescence Cell Analyzer</i>	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Microsoft MS Office 2016	Microsoft, Unterschleisheim
QPCR Software MxPro Version 4.1	Agilent Tech., Waldbronn
R Core Team Version 3.4.1	<i>R Foundation for Statistical Computing</i> , Wien, Österreich

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle in Kultur gehaltenen Zelllinien wurden unter Verwendung des Kulturmediums *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, *high glucose*) mit Zusätzen, („Komplettmedium“) kultiviert. Für die stabil transfizierten Zellklone PANC-1/EGFP-14, PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.1, PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.4 und PANC-1/EGFP-K-Ras(N17)-5x wurde dem Medium zur Selektion zusätzlich 1 mg/ml G418-Sulfat hinzugegeben. Die immortalisierte epitheliale Pankreaszelllinie H6c7 wurde in RPMI-1640 Medium mit Zusätzen kultiviert. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C, 8 % CO₂ und 90 % Luftfeuchte („Standardbedingungen“) in einem CO₂-Inkubator kultiviert. Zur optimalen Vitalität der Zellen wurde das Medium nach 2-3 Tagen gewechselt und nach Erreichen einer Konfluenz von 90-100 % wurden die Zellen passagiert (siehe Abschnitt 3.1.3).

Komplettmedium: DMEM (*high glucose*); 10 % (V/V) Fötale Kälberserum (FCS); 1 % (V/V) MEM-Non Essential Amino Acids; 1 % (V/V) GlutaMAX™

RPMI-Medium mit Zusätzen: 50 % (V/V) RPMI-1640 Medium; 50 % (V/V) *keratinocyte serum-free medium*; 5 % (V/V) FCS; 1 % (V/V) GlutaMAX™; 50 µg/ml *bovine pituitary extract*; 5 ng/ml EGF

3.1.2 Auftauen eukaryotischer Zellen

Um Zellen in Kultur zu nehmen, wurde das entsprechende Kryoröhrchen aus der Stickstoff-Lagerung entnommen und direkt bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Kryokonservierung erfolgte unter Benutzung der zelltoxischen Substanz Dimethylsulfoxid (DMSO). Um diese aus dem Medium zu entfernen, wurde die Zellsuspension in 5 ml warmes Komplettmedium überführt, für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 5 ml Komplettmedium aufgenommen, in ein geeignetes Zellkulturgefäß gegeben und mit Komplettmedium auf ein angemessenes Volumen aufgefüllt. Nach 24 h Kultivierung wurde das Medium gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

3. Methoden

3.1.3 Passagieren eukaryotischer Zellen mit Trypsin-EDTA

Um ein optimales Wachstum der Zellen zu ermöglichen, wurden diese ab einer Konfluenz von 90-100 % passagiert. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 1x CMF-PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Ablösung der Zellen von der Kulturoberfläche durch Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA (0.05 %) für 2-5 min bei 37 °C. Im Anschluss wurden die Zellen in 5 ml Kompletmedium aufgenommen und bei 1000 x rpm, 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Kompletmedium resuspendiert sowie die Zellsuspension in gewünschter Verdünnung in ein geeignetes Zellkulturgefäß gegeben.

1x CMF-PBS: 140 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM KH₂PO₄; pH 7.2

3.1.4 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum stabil zu lagern, wurden diese im Einfriermedium in einem Kryoröhrchen in Stickstoff eingefroren. Zur Befüllung von zwei 1.8 ml Kryoröhrchen wurde eine 10 cm Schale mit konfluent gewachsenen Zellen der jeweiligen Zelllinie benötigt, um eine geeignete Zellzahl beim Wiederauftauen zu erhalten. Es wird eine hohe Zellzahl benötigt, da sowohl bei dem Einfrierprozess, als auch bei dem Auftauen der Zellen ein Teil der Zellen stirbt. Die Zellen wurden wie in 3.1.3 beschrieben von der Schalenoberfläche gelöst und bei 1000 rpm 3 min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1.8 ml kaltem Kompletmedium aufgenommen. Nach Überführen von 0.9 ml Zellsuspension in eines der Kryoröhrchen wurde langsam 0.9 ml Einfriermedium hinzugefügt. Um die Zellen schonend einzufrieren wurden diese bei Raumtemperatur in ein mit Isopropanol befülltes Gefäß gegeben und anschließend bei -80 °C für 2-3 Tage gelagert. Zur Langzeitkonservierung wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Einfriermedium: DMEM (*high glucose*); 20 % (V/V) FCS; 1 % (V/V) MEM-*Non Essential Amino Acids*; 1 % (V/V) GlutaMAX™; 10 % (V/V) DMSO

3.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl in einer Zellsuspension wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurden 10 µl einer Zellsuspension unter das Deckglas einer Neubauer-Zählkammer aufgebracht und die Zellzahl auf 4 Großquadranten mikroskopisch bestimmt. Der ermittelte Durchschnittswert multipliziert mit 10⁴ ergibt die Zellzahl pro ml.

3. Methoden

3.1.6 Transfektion von Zellen mit siRNA

Für eine Verminderung der Proteinexpression der Akt-Isoformen wurde eine Transfektion mit *SmartPool silencer* RNA (siRNA) durchgeführt. In diesem Verfahren wird eine kurze RNA-Nukleotidsequenz von 20-25 bp (siRNA) in die Zellen eingebracht, welche eine spezifische komplementäre Sequenz zur Ziel-mRNA besitzt und durch Bindung an diese zu deren Abbau führt. Bei den eingesetzten *SmartPool* Akt1-, Akt2- und Akt3-siRNAs handelt es sich um eine Zusammenstellung von jeweils vier verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen die jeweils gleiche mRNA (Sequenzen der verwendeten siRNAs siehe Tabelle 2-8). Zur Kontrolle unspezifischer Effekte von siRNAs diente ein *Pool* aus vier verschiedenen siRNAs, die keine komplementäre Zielsequenz besitzen („siScrambled“). Für jede Zelllinie wurden die Bedingungen der Transfektion (Reagenz; Zellzahl; siRNA-Konzentration) in Vorversuchen getestet. Eine Übersicht der Bedingungen für siRNA-Transfektionen der verschiedenen Zelllinien ist Tabelle 3-1 zu entnehmen.

Für die Transfektion von PANC-1 Zellen und PANC-1-Zellklonen wurden diese mit 1×10^5 Zellen/Loch in einer 12-Lochplatte ausgesät. Die Transfektion erfolgte am nächsten Tag (Konfluenz der Zellen 70 - 80 %) mit dem Reagenz DMRIE-C und 50 nM siRNA. Hierzu wurden 4 µl DMRIE-C mit 100 µl Opti-MEM gemischt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend 2.5 µl einer 10 µM siRNA-Stocklösung hinzugegeben, durchmischt und 10 min bei RT inkubiert. Das Medium in der 12-Lochplatte wurde auf 400 µl Gesamtmenge reduziert. Der gesamte Transfektionsansatz wurde mit der Pipette gemischt und tropfenweise in das Medium der Zellen gegeben. Nach Zugabe des Transfektionsansatzes erfolgte eine Inkubation für 6 h bei 37 °C und 8 % CO₂. Anschließend wurden in jedes Loch weitere 500 µl Kompletmedium hinzugegeben und nach weiteren 24 h Inkubation unter Standardbedingungen das Medium abgesaugt und pro Loch 1 ml frisches Kompletmedium hinzugegeben. Die Transfektion wurde nach 24 h erneut durchgeführt, um eine höhere Effizienz des *knockdowns* zu erreichen.

Für eine siRNA-Transfektion von H23 Zellen wurden diese mit einer Zellzahl von 1.5×10^5 Zellen/Loch in eine 12-Lochplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde die Transfektion mit dem Reagenz DharmaFECT1 und 50 nM siRNA nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 2.5 µl DharmaFECT1 mit 100 µl DMEM gemischt und 5 min bei RT inkubiert. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 5 µl einer 10 µM siRNA-Stocklösung mit 100 µl DMEM gemischt und 5 min inkubiert. Die siRNA-Lösung wurde in die Lösung mit dem Transfektionsreagenz überführt, gemischt und 20 min inkubiert. Das Medium jedes Lochs wurde abgesaugt und jeweils 800 µl Kompletmedium eingefüllt. Der gesamte Transfektionsansatz wurde mit der Pipette gemischt und tropfenweise in das Medium der Zellen gegeben.

3. Methoden

COLO-699 Zellen wurden für eine Transfektion mit 4×10^5 Zellen/Loch in eine 6-Lochplatte ausgesät. Die Transfektion erfolgte am Folgetag der Zellaussaat mit DharmaFECT1 wie zuvor beschrieben. Es wurden hierbei 7.5 μl DharmaFECT1 und 50 nM siRNA verwendet und die Ansätze erfolgten in je 200 μl DMEM. Das Medium in jedem Loch wurde vor Transfektion abgesaugt und jeweils 1600 μl frisches Komplettmedium hinzugegeben. Der gesamte Transfektionsansatz wurde mit der Pipette gemischt und tropfenweise in das Medium der Zellen gegeben. Nach 6 h und 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und frisches Komplettmedium hinzugegeben.

Tabelle 3-1. Übersicht der Ansätze für siRNA-Transfektionen. cEND = Endkonzentration

Zelllinie	Zellzahl/Loch; Format	Transfektions- reagenz; Menge	Transfektionsansatz: Medium; Menge	siRNA (cEND)
PANC-1/ PANC-1 - Zellklone	1×10^5 ; 12-well	DMRIE-C; 4 μl	Opti-MEM; 100 μl	50 nM
COLO-699	4×10^5 ; 6-well	DharmaFECT1; 7.5 μl	DMEM; 200 μl	50 nM
H23	1.5×10^5 ; 12-well	DharmaFECT1; 2.5 μl	DMEM; 100 μl	50 nM

3.1.7 Analyse der Zellmigration mittels *Wounding-Assay*

3.1.7.1 Effekt verschiedener Inhibitoren auf die Zellmigration

Zur Analyse des Einflusses von Akt und Akt-abhängigen Effektoren auf die Zellmigration wurden *Wounding-Assays* mit Zusatz verschiedener Inhibitoren durchgeführt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen in einer 6-Lochplatte ausgesät (Zellzahlen siehe Tabelle 3-2) und bis zur vollständigen Konfluenz im CO₂-Inkubator unter Standardbedingungen kultiviert. Auf der Unterseite der 6-Lochplatte wurden vor der Aussaat der Zellen zur späteren Orientierung drei vertikale Linien mit einem Faserstift gezogen. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zur Inhibition der Proliferation 2 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ (COLO-699, H23) oder 10 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C (PANC-1) behandelt. Anschließend wurden drei bis fünf vertikale Kratzer mit einer 200 μl Pipettenspitze oder – für einen breiteren Spalt – mit einer 1000 μl Pipettenspitze in den Zellrasen gezogen und unter dem Mikroskop die gleichmäßige Breite der zellfreien Spalten kontrolliert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und zur Entfernung abgelöster Zellen der Ansatz zwei Mal mit DMEM gewaschen. Zur Induktion der Zellmigration wurden die Zellen in 2 ml DMEM mit 1 % FCS (PANC-1) oder 2 ml DMEM mit 5 % FCS (H23, COLO-699) 2 h im CO₂-Inkubator inkubiert. Danach wurde die pharmakologische Substanz (Übersicht der Substanzen siehe Tabelle 3-3) oder DMSO (0.1 %) als Kontrolle in das Medium gegeben. Die entstandenen Spalten wurden mit dem JuLi *Smart Fluorescence Cell Analyzer* bei 10x oder 20x Vergrößerung an 9 willkürlich ausgewählten Stellen pro Loch aufgenommen.

3. Methoden

Zur Erfassung der Zellmigration wurden sowohl 2 h nach dem *Wounding* (t_0), nach 24 h (t_{24}) und nach 48 h (t_{48}) die ausgewählten Stellen mit dem JuLi *Smart Fluorescence Cell Analyzer* fotografiert. Die Spaltbreite jedes Spaltes wurden mit dem Programm AnalySIS vermessen und der prozentuale Verschluss des Spaltes unter Verwendung von MS Office Excel berechnet. Die Zellen wurden anschließend zum Nachweis der Wirksamkeit der pharmakologischen Substanzen in 80-100 μ l RIPA-Puffer lysiert und die Proteinexpression und Phosphorylierung von Akt, ERK, S6, MDM2 und p53 mit spezifischen Antikörpern im Immunblotverfahren ermittelt (siehe Abschnitt 3.2.3-3.2.5).

Tabelle 3-2. Übersicht der Zellzahlen für *Wounding-Assays*

Zelllinie	Zellzahl	Format
COLO-699	6×10^5	6-well
H23	6×10^5	6-well
PANC-1	4×10^5	6-well

Tabelle 3-3. Übersicht der verwendeten pharmakologischen Substanzen in *Wounding-Assays*

Substanz	Zielprotein	Lösungsmittel	Endkonzentration
AktVIII	Akt1/2/3-Inhibitor	DMSO	5 μ M; 10 μ M
Nutlin-3	MDM2-Inhibitor	DMSO	10 μ M
PD98059	MEK1-Inhibitor	DMSO	25 μ M
Pifithrin- α	p53-Inhibitor	DMSO	10 μ M; 25 μ M
Rapamycin	mTOR-Inhibitor	Methanol	100 nM
SC-79	Akt1/2/3-Aktivator	DMSO	1 μ M; 10 μ M
UO-126	MEK1/2-Inhibitor	DMSO	1 μ M; 10 μ M

3.1.7.2 Analyse der Rolle der Akt-Isoformen in der Migration

Um die Bedeutung der einzelnen Akt-Isoformen in der Migration zu analysieren, wurde eine Depletion der einzelnen Akt-Isoformen mittels siRNA durchgeführt. Wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben wurden die Zellen in einer 6-Lochplatte (COLO-699) oder 12-Lochplatte (PANC-1, PANC-1 -Zellklone, H23) ausgesät, transfiziert und 54 h nach Transfektion *Wounding-Assays* durchgeführt. Zur Erfassung der Zellmigration wurden an 9 Stellen pro Loch 2 h nach dem *Wounding* (t_0), nach 24 h (t_{24}) und nach 48 h (t_{48}) die Spalten mit dem JuLi *Smart Fluorescence Cell Analyzer* fotografiert. Die Fläche jedes Spaltes wurde mit dem Programm Fiji vermessen und die zurückgelegte Strecke/Wundrand [μ m] unter Verwendung von MS Office Excel berechnet. Die Zellen wurden anschließend zum Nachweis der Wirksamkeit der Behandlungen in RIPA-Puffer lysiert und die Proteinexpression der Akt-Isoformen sowie die Akt-Phosphorylierung mit spezifischen Antikörpern im Immunblotverfahren analysiert (siehe Abschnitt 3.2.3-3.2.5).

3. Methoden

3.1.8 Analyse der Aktin-Dynamik mittels Lebendzell-Aufnahmen

Zur Ermittlung der Effekte von Akt auf das Aktin-Zytoskelett wurde das Aktinfilamentsystem mithilfe einer SiR-Actin-Lösung visualisiert. Diese Färbung ermöglicht die Visualisierung des F-Aktins in lebenden Zellen, da es sich hierbei um einen Farbstoff handelt, welcher auf dem Fluorophor Silikon Rhodamin (SiR) und dem F-Aktin-bindenden Produkt Jasplakinolid basiert. Eine Visualisierung ist bei 674 nm möglich. Die Färbung von HCC-44 und PANC-1 Zellen erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Dazu wurde eine 1 mM Stock-Lösung der SiR-Actin-Lösung hergestellt. Die Stocklösung wurde 1:500 (für HCC-44) oder 1:1000 (für PANC-1) in serumfreiem Medium verdünnt und als Färbelösung verwendet.

Für die Aufnahme von Einzelzellen wurden HCC-44 Zellen mit 5×10^3 Zellen/Loch und PANC-1 Zellen mit 5×10^4 Zellen/Loch im *LabTek® Chamber slide™ System, 2 chamber 2* ausgesät und zum vollständigen Absetzen auf der Glasoberfläche 2 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wiesen zwei Tage nach Aussaat eine Konfluenz von 50-60 % auf. Die Färbung erfolgte mit 800 µl Färbelösung für 30 min bei 37 °C. Nach der Färbung wurde das Medium gewechselt, 50 nM HEPES-Lösung als CO₂-Puffer hinzugegeben und die Zellen mit SC-79 (10 µM) oder DMSO (0.1 %) behandelt. Direkt anschließend wurde eine Aufnahme am Fluoreszenz-Mikroskop Olympus IX81 im Cy5-Filter (674 nm) im Intervall von 3-5 min bis zu 1 h bei 37 °C programmiert. Sollte die Migration nach *Wounding* beobachtet werden, so wurden HCC-44 Zellen mit 2×10^4 Zellen/Loch bis zu einer Konfluenz von 100 % kultiviert. Die Färbung erfolgte wie zuvor beschrieben. Direkt nach erfolgter Färbung wurde mit einer 200 µl Pipettenspitze eine Wunde in die konfluenten Zellen eingebracht, der Ansatz zwei Mal mit DMEM gewaschen und anschließend 500 µl DMEM mit 5 % FCS hinzugefügt. Die Zellen wurden für 30 min im Brutschrank inkubiert und anschließend am Fluoreszenzmikroskop im Intervall von 10 min über 4 h fotografiert.

3.1.9 Immunhistochemische Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung von Zellen wurden diese in einer 6-Lochplatte mit 2×10^4 Zellen/Loch auf einem Deckglas ausgesät und für 48 h im CO₂-Inkubator unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden über Nacht in DMEM ohne Zusätze kultiviert und dann mit SC-79 (10 µM) jeweils für 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min oder 240 min behandelt. Zur Kontrolle erfolgte ebenso eine Behandlung mit DMSO (0.1 %) in den gleichen Zeitspannen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml 1x CMF-PBS gewaschen, mit 0.5 ml 2 % Paraformaldehyd in 1x CMF-PBS überschichtet und für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurde mit 1 ml 1x CMF-PBS gewaschen und jede Probe zur Permeabilisierung der Membran mit 0.5 ml 0.2 % Triton X-100 in TBS für 8 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1 ml 3 % BSA in

3. Methoden

TBS + 0.1 % Tween20® (TBS/T) für 1 h unter leichtem Schütteln abgesättigt. Nach erneutem Waschen mit 1 ml TBS wurde 30-50 µl Primärantikörper-Lösung auf das Deckglas getropft und für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Es wurde erneut dreimal mit 1 ml TBS gewaschen und jedes Deckglas mit 30-50 µl Sekundärantikörper-Lösung für 1 h lichtgeschützt in einer feuchten Kammer inkubiert. α -Tubulin wurde durch einen anti- α -Tubulin-Antikörper (Verdünnung siehe Tabelle 2-2) mit anschließendem Nachweis durch einen Maus-Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000 in 0.3 % BSA in TBS/T) detektiert. Für eine Färbung des Zellkerns durch den Farbstoff DAPI (100 µg/ml) wurde dieser in einer Verdünnung von 1:500 zur Sekundärantikörper-Lösung hinzugegeben. Ebenso wurde mit der direkten Färbung von F-Aktin durch Phalloidin-TexasRed (100 µg/ml) verfahren (Verdünnung 1:200). Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 1 ml TBS und einmal mit 1 ml H₂O gewaschen und die Färbung am Fluoreszenz-Mikroskop Olympus IX81 überprüft. Anschließend wurden die Objekte auf Deckgläsern mit Elvanol eingedeckt und am Fluoreszenz-Mikroskop unter Berücksichtigung des Absorptionsmaximums des verwendeten Fluorochroms analysiert.

Elvanol: 0.1 M Tris, pH 8.5; 25 % (m/V) Glycerin; 10 % (m/V) Mowiol 4-88

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Analyse zellulärer Proteine wurden Zellen nach entsprechender Kultivierung und Behandlung in detergenzhaltigen Puffern lysiert. Hierzu wurden die Zellen mit eiskaltem 1x TBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA-Puffer) oder NP-40-Lysepuffer, versetzt mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren, überschichtet. Protease- und Phosphatase-Inhibitoren wurden direkt vor Gebrauch frisch hinzugegeben. Für COLO-699 Zellen wurde RIPA-Puffer ohne Natriumdesoxycholat eingesetzt. Die Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers von der Petrischale abgeschabt und die Zellsuspension in ein vorgekühltes 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Lysat wurde durch eine Tuberkulinspritze mit Kanüle 25G aufgezogen und durch mehrmaliges Aufziehen homogenisiert. Die unlöslichen Bestandteile des Zellhomogenisats wurden durch eine Zentrifugation (15 min, 16.000 x g, 4 °C) abgetrennt und der Überstand mit den löslichen Proteinen in ein eisgekühltes 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels *bicinchoninic acid* (BCA) Assay (siehe Kapitel 3.2.2) bestimmt. Die Lysate wurden entweder direkt für eine Auftrennung in einer SDS-PAGE vorbereitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

Tris buffered saline (TBS) 1x: 10 mM Tris/HCl pH 7.4; 150 mM NaCl

3. Methoden

RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7.2; 150 mM NaCl; 0.1 % (V/V) SDS; 0.5 % (m/V) Na-Deoxycholat, 1 % (V/V) Triton X-100

Protease-Inhibitoren: 1 mM Pefabloc; 1 μ M Aprotinin; 2.1 μ M Leupeptin; 5 μ M Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)

Phosphatase-Inhibitoren: 10 mM Na-Pyrophosphat; 25 mM β -Glycerophosphat; 2 mM Na-Orthovanadate, 10 mM Na-Fluorid

NP-40-Lysepuffer: 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 2 mM EDTA; plus: 50 mM Na-Fluorid, 10 mM Na-Pyrophosphate, 10 % Glycerin; 1 mM Na-Orthovanadat, 1 mM PMSF, 2.1 μ g/ml Aprotinin, 1 mM Leupeptin

3.2.2 Kolorimetrische Proteinbestimmung mittels BCA Assay

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration eines Zelllysates wurde der *BCA Assay* (Pierce) verwendet. In diesem *Assay* wird die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in einem alkalischen Medium analysiert. Die Kupferkationen werden durch die Reaktion mit Bicinchoninsäure kolorimetrisch sichtbar und können anschließend photometrisch erfasst werden. Die Proteinkonzentration der Lösung kann anhand der Geradengleichung einer Eichreihe mit bekannter Proteinkonzentration ermittelt werden. Für die Eichgerade wurde eine BSA-Stammlösung mit 2 mg/ml hergestellt und eine Konzentrationsreihe der Proteinlösung angesetzt. Es wurden hierzu 0 μ l, 2 μ l, 4 μ l, 6 μ l, 8 μ l, 10 μ l und 12.5 μ l BSA-Stammlösung in Doppelwerten in eine 96-Lochtiterplatte pipettiert und mit doppelt destilliertem Wasser (ddH_2O) auf 20 μ l aufgefüllt. Die zu messenden Proben wurden 1:10 mit ddH_2O vorverdünnt und 20 μ l der verdünnten Probe in Doppelwerten in die Mikrotiterplatte gegeben. Für das Farbreagenz wurden 50 Volumenteile *Pierce BCA Protein Assay Reagent A* mit einem Volumenteil 4 % (V/V) Kupfer-(II)-sulfat-Lösung gemischt. In jedes Loch wurden 180 μ l Farbreagenz zugegeben und die Mikrotiterplatte 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 562 nm im *ELx800 Absorbance Microplate Reader*.

3.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Laemmli beruht auf der Grundlage der Auftrennung eines Proteingemisches nach der molekularen Masse in einem elektrischen Feld [99]. Zur besseren Fokussierung erfolgte die Auftrennung mithilfe eines zweischichtigen Gelsystems mit Sammel- und Trenngel. Hierzu wurde zuerst das Trenngel in eine Gießvorrichtung gegossen. Es wurde sofort mit wasser-gesättigtem Isobutanol überschichtet, um einen luftblasenfreien und ebenen Abschluss des Gels zu erhalten. Abhängig von der Größe des nachzuweisenden Proteins wurde jeweils der prozentuale Anteil an Acrylamid und Bisacrylamid im Trenngel angepasst

3. Methoden

(siehe Tabelle 3-4). Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen und der Kamm zwischen die Glasplatten gesteckt. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels wurden die Glasplatten aus der Gießvorrichtung entfernt und der Kamm aus dem Gel gezogen. Die Glasplatten wurden in der Gelelektrophoresekammer befestigt und mit Elektrophoreselaufpuffer aufgefüllt.

Tabelle 3-4. SDS-PAGE Ansatz: für 2 Mini-Gele (5 x 8 cm) oder 1 großes Gel (5 x 12 cm).

	Trenngel				Sammelgel
	7.5 %	8.5 %	10 %	12.5 %	
30 % (m/V) Acrylamid	2 ml	2.3 ml	2.6 ml	3.25 ml	0.38 ml
2 % (m/V) Bisacrylamid	0.8 ml	0.9 ml	1 ml	1.2 ml	0.15 ml
3 M Tris pH 8.8	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-
1 M Tris pH 6.8	-	-	-	-	0.38 ml
10 % (m/V) SDS	0.08 ml	0.08 ml	0.08 ml	0.08 ml	0.08 ml
60 % (m/V) Saccharose	-	-	-	-	0.75 ml
ddH₂O	4.1 ml	3.6 ml	3.2 ml	2.45 ml	1.3 ml
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	4 µl
10 % (m/V) APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	40 µl
Trennbereich	200-60 kDa	150-50 kDa	130-30 kDa	100-20 kDa	-

Die im Lysat vorhandenen Proteine müssen vor der Elektrophorese denaturiert werden, um eine Auftrennung gemäß dem Molekulargewicht im Gel zu gewährleisten. Dazu wurden 30-50 µg des Lysats 5:1 mit 5x SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden mithilfe einer Mikrotiterspritze in die Taschen des Gels gegeben sowie 1 µl eines Proteinstandards aufgetragen (*Page Ruler™ Prestained Protein Ladder*, Fermentas oder *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standard*, Bio-Rad), der 1:10 in 5x SDS-Probenpuffer verdünnt wurde. Für die Gelelektrophorese wurde die Spannung auf 100 V konstant gehalten und die Auftrennung erfolgte solange, bis die blaue Lauffront das Ende des Gels passierte. Das Gel wurde anschließend aus den Glasplatten gelöst und je nach Fragestellung erfolgte entweder eine Färbung mit Coomassie-Brilliant Blue oder eine Immundetektion mittels Western Blot.

Elektrophoreselaufpuffer: 0.5 M Tris; 384 mM Glycin, 0.1 % (m/V) SDS

5x SDS-Probenpuffer: 0.2 M Tris pH 8.8; 5 mM EDTA; 1 M Saccharose;

0.02 % (m/V) Bromphenolblau; 2 % (m/V) SDS; 0.5 M DTT

3. Methoden

3.2.4 Qualitativer Proteinnachweis mittels Coomassie-Färbung

Für einen qualitativen Nachweis der Proteine sowie deren Auftrennung wurde eine kolloidale Färbung des Gels mit einer Coomassieblau-Lösung angefertigt. Das Gel wurde in die Coomassieblau-Lösung eingelegt und über Nacht bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Für die Entfärbung des Gels wurde dieses für 4-5 h in eine Entfärbelösung bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert und anschließend in H₂O aufbewahrt. Die Dokumentation des Gels erfolgte mithilfe eines Scanners.

Coomassieblau-Lösung: 0.025 % (m/V) Coomassie Brilliant Blue® R-250;
10 % (V/V) Essigsäure; 25 % (V/V) Isopropanol

Entfärbelösung: 10 % (V/V) Essigsäure; 12.5 % (V/V) Isopropanol

3.2.5 Spezifischer Proteinnachweis durch Immunblotting

3.2.5.1 Western Blot

Für den spezifischen Proteinnachweis mit Hilfe spezifischer Antikörper müssen die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Der Immunblot wurde als *Wet*-Blot in einer Miniblot-Kammer mit einsetzbaren Blotting-Gittern durchgeführt. Für den Transfer wurde eine Nitrozellulose-Membran, das aus den Glasplatten gelöste Gel, 4 Whatman® Blotting-Papiere sowie 2 raue und 4 glatte Schwammtücher in Transferpuffer äquilibriert. Die Komponenten wurden wie folgt luftblasenfrei übereinander in ein Blotgitter gelegt: 1 raues Schwammtuch, 2 glatte Schwammtücher, 2 Whatman® Blotting-Papiere, Nitrozellulose-Membran, Gel, 2 Whatman® Blotting-Papiere, 2 glatte Schwammtücher, 1 raues Schwammtuch. Das Gitter wurde so in die Blot-Kammer gestellt, dass die Nitrozellulose-Membran in Richtung der Anode zeigte. Die Blot-Kammer wurde auf einen Magnetrührer gestellt und ein Rührfisch in die Kammer gelegt. Für den Standardtransfer wurde unter ständigem Rühren konstant eine Spannung von 70 V angelegt. Je nach molekularer Masse des nachzuweisenden Proteins wurden verschiedene Zeitspannen und Temperaturbedingungen für den Transfer gewählt. Bei Proteinen von 30 kDa wurde 45 min transferiert, bei Proteinen bis 60 kDa wurde 1 h – jeweils bei Raumtemperatur – transferiert. Ab einem höheren Molekulargewicht bis zu 100 kDa wurde 2.5 h bei 4 °C transferiert. Bei Molekulargewichten oberhalb von 100 kDa wurde die Übertragung mit 20 V bei 4 °C über 10-13 h durchgeführt. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in ddH₂O gewaschen.

Transferpuffer: 25 mM Tris; 0.1 % (m/V) SDS; 1.5 % (m/V) Glycin; 20 % (V/V) Methanol

3. Methoden

3.2.5.2 Ponceau-S Färbung

Die Membran wurde zur Kontrolle des Transfers 5 min unter Schütteln mit Ponceau-S Lösung angefärbt, die Färbung am Scanner dokumentiert und die Farbe anschließend unter fließendem ddH₂O wieder ausgewaschen.

Ponceau-Lösung: 0.2 % (V/V) Ponceau-S-Rot; 3 % (V/V) Trichloressigsäure (TCA)

3.2.5.3 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper

Für den spezifischen Nachweis mit spezifischen Antikörpern wurde die Nitrozellulose-Membran abhängig von dem verwendeten Primärantikörper für 1 h in 10 ml 5 % Milchpulver in TBS + 0.1 % Tween20® (TBS/T) oder 3 % BSA in TBS/T (Übersicht der verwendeten Blockierungslösung siehe Tabelle 2-2) auf der Wippe bei RT inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen der Proteine zu blockieren. Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde die Membran zunächst mit der entsprechenden Primärantikörper-Lösung in angegebener Verdünnung (siehe Tabelle 2-2) bei 4 °C über Nacht auf der Wippe inkubiert. Anschließend wurde 2 x 10 min mit 10 ml TBS/T und 1 x 10 min mit 10 ml TBS auf der Wippe gewaschen und die Sekundärantikörper-Lösung hinzugefügt. Die Verdünnung der Sekundärantikörper erfolgte wie in Kapitel 2-5 angegeben in TBS. Die Inkubation erfolgte für 1 h auf der Wippe bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut 2 x 10 min mit 10 ml TBS/T und 1 x 10 min mit 10 ml TBS gewaschen. Die Visualisierung der Proteine konnte je nach Kopplung der Sekundärantikörper mittels verschiedener Methoden erfolgen. Es standen sowohl Chemilumineszenz-gekoppelte Sekundärantikörper als auch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper und alkalische-Phosphatase(AP)-gekoppelte Antikörper zur Verfügung.

3.2.5.4 Nachweis von Proteinen mittels Chemilumineszenz

Für den Nachweis von Proteinen mittels Chemilumineszenz wurden *horseradish-peroxidase* (HRP)-gekoppelte Antikörper verwendet. Diese konnten über eine *enhanced chemiluminescence* Reaktion mit dem *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* am Fusion SL4-3500.WL *Chemiluminescence Imagingssystem* sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die Membran mit 2 ml eines 1:1 Gemisches der *Luminol/Enhancer Solution* und der *Stable Peroxide Solution* für 2 min inkubiert. Das vorhandene Luminol wird durch die HRP oxidiert und setzt dabei Licht frei. Die Chemilumineszenz wurde mit der im *Imagingsystem* vorhandenen Kamera detektiert. Konnte mit dem *SuperSignal® West Pico Chemoluminescent Substrate* kein ausreichendes Signal detektiert werden, so wurde das *Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate* verwendet, welches eine höhere Sensitivität aufweist. Hier

3. Methoden

wurden pro Membran 0.5 - 1 ml eines 1:1 Gemisches der *HRP Substrate Luminol Reagent* und der *HRP Substrate Peroxide Solution* auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 min und das Substrat wurde anschließend mittels Filterpapiers komplett abgesaugt. Die Visualisierung der Banden erfolgte wie zuvor beschrieben im Fusion SL4-3500.WL.

3.2.5.5 Nachweis von Proteinen mittels Fluoreszenz

Wurden Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper für den Proteinnachweis gewählt, so stand zur Detektion das *Odyssey® Sa Infrared Imaging System* zur Verfügung. Dieses *Imagingsystem* ist mit zwei Diodenlasern ausgestattet, welche eine Anregung bei 685 nm (Kanal 700; rot) und 785 nm (Kanal 800; grün) ermöglichen. Die emittierte Fluoreszenz wird mithilfe eines Detektors auf Basis von Photodioden aufgenommen. So ist durch die Nutzung der beiden Kanäle eine gleichzeitige Visualisierung von zwei verschiedenen Proteinen möglich, vorausgesetzt, dass die Primärantikörper aus verschiedenen Spezies stammen und die zur Verfügung stehenden CF®680- (685 nm Anregung) und CF®770- (785 nm Anregung) gekoppelten Sekundärantikörper entsprechend der Spezies des Primärantikörpers eingesetzt wurden. Die Membran kann zur Visualisierung direkt in das *Imagingsystem* eingelegt und bei verschiedenen Sensitivitäten gescannt werden.

3.2.5.6 Visualisierung von Proteinen mittels Alkalische-Phosphatase-Färbung

Die dritte mögliche Nachweismethode ist die Färbung mit alkalischer Phosphatase. Dazu wurde die Membran 1 h mit dem AP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und 1 x 10 min mit 10 ml TBS und anschließend 2 x 10 min mit 10 ml AP-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Enzymreaktion. Hierzu wurde ein Teil 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)-Lösung mit einem Teil 4-Nitro-*blue*-tetrazolium-chlorid(NBT)-Lösung und 25 Teilen AP-Puffer gemischt und auf die Membran gegeben. Sobald die Proteine als braune Banden gut erkennbar waren, wurde die Entwicklungslösung mit 1x TBS abgewaschen und die Färbung anschließend mit dem Scanner dokumentiert.

AP-Puffer: 50 mM Tris/HCl; 50 mM MgCl₂, pH 9.4

NBT-Lösung: 10 mM NBT gelöst in 1 ml H₂O

BCIP-Lösung: 5 mg BCIP gelöst in 1 ml H₂O

3.2.5.7 Elution gebundener Antikörper von der Nitrozellulose-Membran

Zur erneuten Färbung von Nitrozellulose-Membranen, die bereits mit Antikörpern inkubiert wurden, konnten die gebundenen Antikörper von der Membran eluiert werden. Dazu wurde der Immunblot 15-30 min mit Elutionspuffer inkubiert und anschließend zwei Mal für 10 min in 50 ml ddH₂O unter Schütteln gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden erneut

3. Methoden

mit der entsprechenden Lösung blockiert und eine erneute Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper durchgeführt.

Elutionspuffer: 0.2 M Glycin; 0.5 M NaCl, pH 2.8

3.2.6 Analyse des Effekts von Wachstumsfaktoren auf die Akt- und S6-Phosphorylierung

Zur Analyse der Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Akt-, und S6-Phosphorylierung wurden PANC-1, MIA PaCa-2, COLO-699 und H23 Zellen in 6-Lochplatten ausgesät (Zellzahl siehe Tabelle 3-5) und bis zu einer Konfluenz von 80 % im CO₂-Inkubator bei 37 °C kultiviert. Am Folgetag wurde das Medium abgesaugt und 2 ml DMEM ohne Zusätze hinzugefügt. Die Zellen wurden für 15 h in diesem Medium inkubiert und anschließend 12 min mit EGF (10 ng/ml oder 30 ng/ml), IGF-1, FGF-2, HGF oder PDGF-AA (alle 10 ng/ml) behandelt. Die Zellen wurden in 80-100 µl RIPA-Puffer lysiert und die Expression und Phosphorylierung von Akt und S6 im Immunblotverfahren analysiert (siehe Abschnitt 3.2.2-3.2.5).

Tabelle 3-5: Übersicht der Zellzahlen für Behandlungen mit Wachstumsfaktoren oder pharmakologischen Substanzen

Zelllinie	Zellzahl	Format
PANC-1	5 x 10 ⁵	6-well
COLO-699	3 x 10 ⁵	6-well
H23	4 x 10 ⁵	6-well
MIA PaCa-2	5 x 10 ⁵	6-well
HCC-44	2 x 10 ⁵	6-well
COLO 357	6 x 10 ⁵	6-well

3.2.7 Analyse der Wirkung von SC-79 auf Akt und Akt-abhängige Signalwege

Die Substanz SC-79 ist als Akt-Aktivator beschrieben und soll die vollständige Phosphorylierung der Akt-Kinasen im Zytosol induzieren [100]. Zur Bestimmung der einzusetzenden Konzentration sowie des Behandlungszeitraums zur ausreichenden Akt-Aktivierung wurden Zellen verschiedener Zelllinien mit SC-79 behandelt. Dazu wurden die Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einer 80%-igen Konfluenz im CO₂-Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 15 h mit serumfreiem Medium inkubiert und in aufsteigender Konzentration mit SC-79 (0.1-100 µM) für 10 min behandelt. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert und die Phosphorylierung von Akt- und ERK1/2-Proteinen wurde im Immunblotverfahren detektiert. Weiterhin wurden jeweils im gleichen Verfahren Zeitreihen im Zeitraum von 1 min bis zu 30 min durchgeführt.

3. Methoden

Nach Ermittlung des Behandlungszeitraums und der adäquaten Konzentration für eine ausreichende Akt-Phosphorylierung wurden die Zelllinien PANC-1, COLO 357, COLO-699 und H23 ausgewählt und die Phosphorylierung der Akt-Substrate S6 und MDM2 sowie in COLO-699 und H23 Zellen auch die Phosphorylierung der GSK3 α/β , FoxO3a und p70S6K im gleichen Verfahren analysiert. Zur Kontrolle der Effekte von SC-79 auf MAPK-Signalwege wurde ebenso in allen Experimenten die Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 detektiert (siehe Abschnitt 3.2.2-3.2.5). Die Versuche, die Zeit- und Konzentrationsreihen beinhalteten, wurden teilweise von Jens Bier, AG Prof. Dr. Giehl, durchgeführt

3.2.8 Analyse der Wirksamkeit verschiedener Inhibitoren und Charakterisierung der Effekte auf Akt-abhängige Signalwege

Zur Analyse der Wirksamkeit verschiedener Inhibitoren und deren Effekt auf die Phosphorylierung von Akt und Akt-Effektoren wurden Zellen der Zelllinien PANC-1, COLO 357, COLO-699 und H23 in 6-Lochplatten (Zellzahlen siehe Tabelle 3-5) ausgesät und bis zu einer 80 %-igen Konfluenz im CO₂-Inkubator bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und 2 ml DMEM hinzugefügt. Die Zellen wurden für 15 h entweder mit einer pharmakologischen Substanz (siehe Tabelle 3-6) oder dem Lösungsmittel DMSO (0.1 %) behandelt. Die Zellen wurden in 70-80 μ l RIPA-Puffer lysiert. Es wurde die Proteinexpression und/oder Phosphorylierung von Akt, ERK1/2, S6, MDM2, p38 und p53 mit spezifischen Antikörpern im Immunblotverfahren analysiert (siehe Abschnitt 3.2.2-3.2.5).

Tabelle 3-6. Übersicht der verwendeten Inhibitoren zur Charakterisierung Akt-abhängiger Signalwege

Pharmakologische Substanz	Ziel	Lösungsmittel	Endkonzentration
AktVIII	Akt1/2/3-Inhibitor	DMSO	10 μ M
LY294002	PI3-K-Inhibitor	DMSO	10 μ M
Nutlin-3	MDM2-Inhibitor	DMSO	10 μ M
Pifithrin- α	p53-Inhibitor	DMSO	25 μ M
Rapamycin	mTOR-Inhibitor	Methanol	100 nM

3.2.9 Charakterisierung des Effektes von SC-79 auf die Phosphorylierung von ERK1/2, p38 und S6

Zur Ermittlung, ob die SC-79-induzierte ERK1/2-, p38- und S6-Phosphorylierung jeweils durch MEK1/2 vermittelt wird, wurden MEK1/2 mit dem spezifischen Inhibitor UO-126 gehemmt. Dazu wurden Zellen der Zelllinien PANC-1, COLO 357 und COLO-699 in 6-Lochplatten ausgesät (Zellzahl siehe Tabelle 3-5) und bis zu einer 80%-igen Konfluenz im CO₂-Inkubator kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen für 15 h mit DMEM inkubiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung für 30 min mit dem Akt-Aktivator SC-79 (10 μ M), dem MEK1/2-Inhibitor UO-126 (10 μ M), dem Akt-Inhibitor AktVIII (10 μ M) oder mit SC-79 (10 μ M) und

3. Methoden

UO-126 (10 μ M) in Kombination. Die Zellen wurden in 80-100 μ l RIPA-Puffer lysiert und im Immunblotverfahren analysiert. Es wurde die Proteinexpression und Phosphorylierung von Akt, ERK, p38 und S6 mit spezifischen Antikörpern im Immunblotverfahren ermittelt (siehe Abschnitt 3.2.2-3.2.5).

3.2.10 Analyse der Kinase-Aktivität der Akt-Isoformen

Zur Analyse der Kinase-Aktivität der verschiedenen Akt-Isoformen wurden in verschiedenen Zelllinien isoformspezifische *in vitro* Kinase-Assays nach einem Protokoll von Prof. Dr. Manfred Jücker (Institut für Biochemie und Signaltransduktion, UKE Hamburg-Eppendorf) durchgeführt. In diesem Assay wird mittels Immunpräzipitation die zu untersuchende Akt-Isoform präzipitiert und daraufhin mit dem GSK3 α / β -GST-Fusionsprotein (GSK3 α / β -GST) als Akt-Substrat inkubiert. Anschließend erfolgt die Analyse der Phosphorylierung der GSK3 α / β -GST an S21/9 im Immunblotverfahren.

3.2.10.1 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation (IP) wurden 25 μ l Protein-G-Agarose (50:50 *slurry*) mit einer abgeschnittenen 200 μ l Pipettenspitze in 500 μ l NP-40-Lysepuffer aufgenommen und die Protein-G Agarose-Beads zweimal zentrifugierend (1 min, 5.000 x g, 4 °C) mit 500 μ l NP-40-Puffer gewaschen. Die Agarose-Beads wurden in 500 μ l NP-40 Lysepuffer aufgenommen und jeweils 2 μ g Akt-isoformspezifischer Antikörper oder als Kontrolle Maus-IgG2a-Antikörper hinzugefügt. Das Gemisch wurde 2 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Protein-G-Agarose-Beads sedimentiert (1 min, 5.000 x g, 4 °C), der Überstand abgenommen und einmal mit 500 μ l NP-40-Lysepuffer gewaschen. Dann wurden – abhängig von der Expression der verschiedenen Akt-Isoformen – 250-1500 μ g des zu analysierenden NP-40-Zelllysates hinzugegeben und insgesamt auf 500 μ l NP-40-Lysepuffer aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 2 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Sollten die Immunpräzipitate direkt im Immunblotverfahren analysiert werden, so wurden die Beads zweimal mit 500 μ l NP-40-Lysepuffer gewaschen, der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet mit 25-30 μ l 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend erfolgte die Analyse im Immunblotverfahren. Sollten die Immunpräzipitate im Kinase-Assay analysiert werden, so wurde wie in Abschnitt 3.2.10.2 beschrieben verfahren.

Antikörper für IP: siehe Kapitel 2.5.3

NP-40-Lysepuffer für IP: 50 mM HEPES pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 % NP-40; 2 mM EDTA; 50 mM NaF; 10 mM Na-Pyrophosphate; 10 % Glycerin; 1 mM Na-Orthovanadate; 2.1 μ g/ml Aprotinin

3. Methoden

NP-40-Lysepuffer für Lysate: 50 mM HEPES pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 % NP-40; 2 mM EDTA; 50 mM NaF; 10 mM Na-Pyrophosphate; 10 % Glycerin; 1 mM Na-Orthovanadate; 1 mM PMSF; 2.1 µg/ml Aprotinin; 1 mM Leupeptin

3.2.10.2 *In vitro* Kinase-Assay

Die *Beads* wurden zentrifugiert (1 min, 5.000 x g, 4 °C), der Überstand abgenommen und verworfen. Das Waschen der *Beads* erfolgte insgesamt zweimal zentrifugierend mit 500 µl NP-40-Lysepuffer sowie einmal mit 500 µl Kinase-Puffer. Der Überstand wurde anschließend vollständig abgenommen und 20 µl des *Kinase Reaction Mix* zu den *Beads* gegeben. Hierzu wurde ein Mastermix wie folgt angesetzt:

Kinase Reaction Mix:

1x Kinase-Puffer, 20 µl
GSK-3α/β-Fusionsprotein (0.5 µg/µl, Cell Signaling), 1 µl
oder GSK-3α-Fusionsprotein (0.5 µg/ml, Promokine), 0.5 µl
ATP (5 mM), 1 µl

Die Ansätze wurden 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend mit 5 µl 10x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt, abzentrifugiert (1 min, 5.000 x g) und der Überstand in der SDS-PAGE (12.5 % Gel) aufgetrennt. Die Analyse der Phosphorylierung des GSK3α/β-Fusionsproteins erfolgte im anschließendem Immunblot mit einem phospho-spezifischen pGSK3α/β-Antikörper (#9327, Cell Signaling). Außerdem wurde die gleichmäßige Präzipitation von Akt mittels Akt1,2,3-Antikörper nachgewiesen. Hierzu wurde als Sekundärantikörper ein *anti-mouse-HRP* TrueBlot® Antikörper eingesetzt, der den in der IP eingesetzten Antikörper nur schwach erkennt, um eine Überschneidung des Signals von Akt (ca. 57-58 kDa) und der schweren Kette des Antikörpers (50-55 kDa) zu verhindern. Anschließend wurde die schwere Kette des Antikörpers mit einem anti-Maus-HRP-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Alternativ erfolgte der Nachweis der Akt-Isoformen im *Odyssey Near Infrared Imaging System* durch Verwendung eines anti-Maus-CF™770-Antikörpers. Hier erfolgte gleichzeitig der Nachweis der schweren Kette des in der Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers.

Kinase-Puffer: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 5 mM β-Glycerophosphate; 0.1 mM Na-Orthovanadate; 2 mM DTT

10x SDS-Probenpuffer: 0.4 M Tris-HCl, pH 8.8; 10 mM EDTA; 2 M Saccharose; 4 % (m/V) SDS; 1 M DTT; 0.02 % (m/V) Bromphenolblau

3. Methoden

3.2.11 Phospho-Akt-Substrat Proteom-Scan

Der Phospho-Akt-Substrat Proteom-Scan wurde durch Nutzung des PTMScan Discovery Services® von *Cell Signaling Technology Inc*™ durchgeführt¹. Die Probenvorbereitung erfolgte nach Anweisung von *Cell Signaling Technology*™ wie nachfolgend beschrieben.

3.2.11.1 Präparation von Zelllysaten

H23 Zellen wurden für je 3 Ansätze in 12 x 10 cm Zellkulturschalen (2.5 x 10⁶ Zellen/ Schale) ausgesät, sodass sie am Folgetag eine Konfluenz von 70-80 % erreichten. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen für 16 h in 10 ml DMEM ohne Zusätze inkubiert. Es erfolgte anschließend entweder eine Behandlung mit SC-79 (10 µM) oder DMSO (0.1 %) für jeweils 30 min. Für den dritten Ansatz mit siRNA-vermittelter Depletion von Akt3 wurden die Zellen 24 h nach Aussaat mit 100 nM *SmartPool* siAkt3 und 10 µl *DharmaFECT1* wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 3.1.6) in insgesamt 4 ml Medium transfiziert und für 6 h unter Standardbedingungen inkubiert. Danach erfolgte ein Medienwechsel, der nach 24 h wiederholt wurde. 54 h nach Transfektion wurden die Zellen für 16 h in 10 ml DMEM ohne Zusätze inkubiert und anschließend erfolgte eine Behandlung mit SC-79 (10 µM) für 30 min.

Für die Lyse wurden die Zellen ein Mal mit 5 ml eiskaltem CMF-PBS gewaschen und in gesamt 9 ml Urea-Lyse-Puffer sequenziell lysiert. Hierzu wurde Schale 1 mit 5 ml CMF-PBS gewaschen und anschließend 9 ml des Urea-Lyse-Puffers hinzugegeben. Die Zellen in Schale 1 wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und der Lysepuffer – bis auf ein Restvolumen von ca. 200 µl – auf die nächste, bereits mit CMF-PBS gewaschene Schale überführt. Die Zellen aus Schale 1 wurde mit einem Zellschaber zusammengekratzt und mit einer Pipette in ein vorgekühltes, auf Eis stehendes 50 ml Gefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen in Schale 2 abgekratzt und das sequenzielle Lysieren für alle verbliebenen Schalen durchgeführt. Vom Gesamtlusat wurden 200 µl für die Analyse im Immunblotverfahren abgenommen und das Lysat im 50 ml Gefäß für 30 min auf Trockeneis schockgefroren. Das für den Immunblot abgenommene Aliquot wurde im Ultraschallbad 3 min sonifiziert, für 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Urea-Lyse-Puffer: 20 mM HEPES, pH 8.0; 9 M Harnstoff; 1 mM Na-Orthovanadate; 2.5 mM Na-Pyrophosphat; 1 mM β-Glycerophosphat

¹ Der Phospho-Akt-Substrat Proteom-Scan wurde im Rahmen des CST PTM Scan Awards 2016 – erhalten auf dem 20th Joint Meeting „Signal Transduction - Receptors, Mediators and Genes“ – von CST durchgeführt.

3. Methoden

3.2.11.2 Analyse der posttranskriptionellen Proteinmodifikationen im Tandem-Massenspektrometer

Die Lysate wurden durch Mitarbeiter von Cell Signaling Technology™ wie folgt analysiert: Die Lysate wurden homogenisiert, sonifiziert und abzentrifugiert. Die Proteine im Überstand wurden mit 4.5 mM DTT für 30 min reduziert und anschließend mit 1/10 des Gesamtvolumens Iodacetamid für 15 min im Dunkeln alkyliert. Die Proben wurden 1:4 mit 20 mM HEPES, pH 8.0 verdünnt und über Nacht mit 10 µg/ml Trypsin verdaut. Anschließend wurden die Proben mit Trifluoressigsäure (TFA) behandelt. Die Peptide wurden über Sep-Pak Classic C18 Säulen entsalzt und mit 40 % Acetonitril in 0.1 % TFA unter Vakuum getrocknet. Die Phosphopeptide wurden durch Immunpräzipitation mit den phospho-Akt-Substrat Motiv-Antikörpern (#9614/#10001 Cell Signaling) angereichert, welche die konservierten Akt-Substrat-Motive (RXXS*/T* bzw. RXRXXS*/T*) erkennen. Anschließend wurden die Peptide direkt auf eine 10 cm x 75 µm PicoFrit Kapillarsäule, befüllt mit Magic C18 AQ *reversed*-Phase Material, geladen. Die Säule wurde mit einem linearen 120-Minuten Gradienten von Acetonitril in 0.125 % Ameisensäure mit einer Fließgeschwindigkeit von 280 nl/min verwendet. Die Tandem-Massenspektren (MS/MS) wurden mit einem Tandem-Massenspektrometer (Orbitrap-QExactive LC-MS/MS ESI-HCD; Thermo Fisher Scientific) mit der Software XCalibur und der Top 20 MS/MS-Methode (Laufzeit 126 min, MS1 Scan Range 300.0-1500.00) ermittelt. Alle drei Proben wurden in Duplikaten analysiert. Die erhalten MS/MS-Spektren wurden mithilfe von SEQUEST® (J.K.Eng *et al.* (1994) *J Am Soc Mass Spectrom.* 5(16) 976-989) und der *Core platform* der *Harvard University* durch Mitarbeiter von Cell Signaling Technology™ analysiert. Die Identifizierung der Peptide wurde unter Verwendung der neuesten Version der Uniprot. *Homo sapiens* Datenbank mit einer Massen-Genauigkeit von +/- 50 ppm für Vorläufer-Ionen und 1 Da für Produkt-Ionen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit einer Massen-Genauigkeit von +/- 5 ppm für Vorläufer-Ionen und Präsenz des vorgeschlagenen Motivs gefiltert. Alle relativen Quantifizierungen erfolgten durch Ermittlung der integrierten *Peak*-Fläche der korrespondierenden, zugewiesenen Peptide. Die Normalisierung der integrierten *Peak*-Flächen wurde mittels einer log₂-median Normalisierungsstrategie durchgeführt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Quantitative Analyse der mRNA-Expression der *AKT*-Varianten mittels reverser Transkriptase-quantitativer PCR (qPCR)

RNA wurde mithilfe des *RNeasy Plus Mini Kits* nach Anweisungen des Herstellers aus konfluenten Zellrasen extrahiert. Zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) wurde 1 µg mRNA mittels oligo-dT Primern und des *SuperScript™ II RT Kits* revers transkribiert. Diese RNA- und cDNA-Präparationen wurden von Mitarbeitern der AG von Frau Prof. Dr. Giehl durchgeführt.

Für die qPCR wurde jeweils ein Mastermix angesetzt:

Pro Probe:

10 µl SYBR® *Green* PCR Mix 2x

0.5 µl 10 pmol/µl Primer *sense*

0.5 µl 10 pmol/µl Primer *antisense*

1 µl cDNA (1:10 verdünnt)

8 µl steriles H₂O

Es wurden spezifische PCR-Primerpaare, wie in Grabinski *et al.* [101] beschrieben, für die Amplifikation folgender Gene verwendet: *AKT1* (NM_001014432), *AKT2* (NM_001626), *AKT3* (NM_005465). Als Kontrolle wurde das Primerpaar RPLP0 zur Amplifikation des *Housekeeping*-Gens *RPLP0* (NM_001002) verwendet. Eine Übersicht der Primer-Sequenzen ist in Tabelle 2-9 dargestellt. Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm: 95 °C 30s, 58 °C (*AKT3*) oder 64 °C (*AKT1*, *AKT2*) 30s, 72 °C 40s für 40 Zyklen und einer finalen Extension bei 72 °C für 10 min mit dem Gerät MX3005P. Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mittels des mitgelieferten Programms MxPro v4.1. Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurde zusätzlich eine semi-quantitative PCR mit dem *FastGene® Taq Ready Mix* anstatt des SYBR® *Green* PCR Mix und dem gleichen PCR-Programm angesetzt. Hierbei diente die Amplifikation mit dem Primerpaar für das β -Aktin-Gen (*ACTB*; NM_001101) als Kontrolle. Für die *ACTB*-Amplifikation wurden 20 Zyklen mit einer *Annealing*-Temperatur von 60 °C verwendet. 10 µl der PCR-Produkte wurden mit 10 x OrangeG-Gelladepuffer versetzt, in einem 2 % Agarose-gel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Kapitel 3.3.2) und durch zugesetztes Midori Green *Advance* visualisiert. Die qPCR-Analysen wurden von Jens Bier, AG Frau Prof. Dr. Giehl, durchgeführt.

3. Methoden

3.3.2 Auftrennung von DNA im Agarosegel

Mithilfe einer Agarosegel-Elektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente in einem Bereich von 0.5 bis 25 kb Länge effektiv aufzutrennen und somit anhand der Größe zu identifizieren. Da kleinere Fragmente einen geringeren Widerstand besitzen, wandern diese im Gel schneller als größere DNA-Fragmente. Die Konzentration der Agarose bestimmt dabei den Trennbereich des Gels, da mit steigender Agarose-Konzentration die Porengröße sinkt und eine Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente ermöglicht wird. Für die Auftrennung der DNA wurden 2 %-ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde 0.6 g Agarose in 30 ml Elektrophoresepuffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer 1x) in einem Mikrowellengerät solange aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Lösung wurde unter fließendem Wasser auf ca. 50 °C abgekühlt und 1.2 µl Midori Green *Advance* hinzugegeben. Anschließend wurde die Agaroselösung luftblasenfrei in einem vorbereiteten Gelschlitten gegossen und ein Kamm eingesteckt. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Agarosegel in eine Elektrophorese-Laufkammer überführt und mit Elektrophoresepuffer vollständig aufgefüllt. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt und die Proben mit 0.25 % (V/V) Gelladepuffer versetzt. Die Proben wurden mit der Pipette vollständig aufgetragen sowie 2 µl des Größenmarkers 1 kb DNA *Ladder* N3232 in eine Tasche gegeben. Für den Lauf wurden 10 V/cm Gel angelegt und nach ausreichender Auftrennung der Banden diese auf dem UV-Transilluminator bei 254 nm ausgewertet und zur Dokumentation fotografiert.

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50 x): 40 mM Tris/HCl, pH 8.0; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA

Gelladepuffer: 10 mM Tris, pH 7.2; 0.1 % Orange G; 30 % (m/V) Glycerin

3. Methoden

3.4 Statistik

Die Berechnung der Standardabweichung (SD) erfolgte mit folgender Formel:

$$SD = \sqrt{[\Sigma(y_i - y_{\text{Mittelwert}})^2 / n - 1]}$$

n = Anzahl der Bestimmungen; y_i = Einzelwert; $y_{\text{Mittelwert}}$ = Mittelwert aller Einzelwerte

Die Berechnung des Standardfehlers (SEM) aus den Mittelwerten von Einzelversuchen erfolgte mit folgender Formel:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

n = Anzahl der Bestimmungen

Die Standardabweichung und der Standardfehler wurden ab einer Anzahl von mindestens drei Bestimmungen berechnet.

Zur Bestimmung der Signifikanz im Vergleich von zwei Gruppen wurde der T-Test (ungepaart, zweiseitig) verwendet. Die Auswertungen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.

4. Ergebnisse

4.1 Effekt von EGFP-K-Ras(V12) auf die Expression und Aktivität der Akt-Isoformen

Im Rahmen ihrer Dissertation „Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras (G12V) auf die Signaltransduktion und Migration von PANC-1 Pankreaskarzinomzellen“ (Universität Ulm 2006), konnte Frau Dr. rer. nat. Monika Unger zeigen, dass die Zellmigration von PANC-1 Zellen durch stabil exprimiertes, konstitutiv aktives EGFP-K-Ras(V12) induziert wird und die Kinasen Akt1 und Akt2 maßgeblich an der Kontrolle der K-Ras-induzierten Migration beteiligt sind. Nach stabiler Expression von EGFP-K-Ras(V12) konnte eine erhöhte, PI3-K-abhängige Akt-Phosphorylierung an S473 nachgewiesen werden [32]. Um nun die Rolle von onkogenem K-Ras und von Akt1, Akt2 und Akt3 in der Migration von Pankreaskarzinomzellen, insbesondere in PANC-1 Zellen zu untersuchen, wurden im ersten Teil dieser Arbeit EGFP-K-Ras(V12)-exprimierende Zellen auf ihren Gehalt der Akt-Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 untersucht sowie im Anschluss deren Kinase-Aktivität analysiert.

4.1.1 Nachweis der Expression von EGFP-K-Ras(V12) und EGFP

Um die Effekte einer onkogenen Mutation in K-Ras4B auf die Expression, Phosphorylierung und Aktivität der Akt-Isoformen zu analysieren, wurden die in der Arbeitsgruppe etablierten PANC-1-Zellklone verwendet, welche konstitutiv aktives EGFP-K-Ras(V12) bzw. EGFP stabil exprimieren. Parentale PANC-1 Zellen weisen eine heterozygote Punktmutation des *KRAS*-Gens auf. Im Kodon 12 ist Glyzin gegen Asparaginsäure ausgetauscht (siehe Kapitel 2.4.1). Die Kontrolle der Expression des EGFP-K-Ras(V12)-Proteins erfolgte durch mikroskopische Analysen. Der EGFP-*Tag* des K-Ras(V12)-Proteins kann bei einer Anregung von 488 nm und Emission von 507 nm im Fluoreszenzkanal sichtbar gemacht werden. Zur Kontrolle wurden Zellklone analysiert, die nur das EGFP-Protein stabil exprimieren. Um die Morphologie der Zellen und die Lokalisation der stabil exprimierten Proteine zu analysieren, wurden Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Aufnahmen lebender PANC-1-Zellklone angefertigt. In Abb. 4-1A sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen der PANC-1-Zellklone EGFP-K-Ras(V12)-4.1 und der Kontrollzellen des Klons EGFP-14 dargestellt. Die Phasenkontrast-Aufnahme der Kontrollzellen mit EGFP-Expression zeigt Zellen mit epithelialem Phänotyp. Dieser Phänotyp zeichnet sich durch eine polygonale Erscheinung und Adhäsion der Zellen untereinander aus. EGFP-K-Ras(V12)-exprimierenden Zellen haben einen veränderten Phänotyp, da diese Zellen sehr flach und fibroblasten-artig ausgebreitet sind und im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Kontrollzellen eine erhöhte Anzahl an Zellausläufern und eine verminderte Zell-Zell-Interaktion aufweisen. In den korrespondierenden Fluoreszenz-

4. Ergebnisse

Aufnahmen ist zu erkennen, dass EGFP-K-Ras(V12) vor allem in der Zellmembran vorliegt, während das EGFP-Protein gleichmäßig im Zytoplasma und dem Zellkern verteilt ist.

4.1.2 Effekt von EGFP-K-Ras(V12) auf die Akt-Phosphorylierung

In ersten Versuchen wurde der Effekt von konstitutiv aktivem EGFP-K-Ras(V12) auf die Akt-Phosphorylierung an S473 analysiert. Dazu wurden RIPA-Zelllysate von konfluent gewachsenen PANC-1 Zellen und den Zellklonen EGFP-14, EGFP-K-Ras(V12)-4.1 und EGFP-K-Ras(V12)-4.4 im Immunblotverfahren mit spezifischen Antikörpern analysiert. In Abb. 4-1B ist ein repräsentativer Immunblot gezeigt. Der Gehalt an phosphoryliertem Akt an S473 ist in den EGFP-K-Ras(V12)-Zellklonen im Vergleich zu parentalen PANC-1 Zellen und dem Klon EGFP-14 deutlich erhöht. Der Nachweis des Akt-Gesamtgehaltes zeigt eine leicht verminderte Expression in den EGFP-K-Ras(V12)-Klonen, auf die im weiteren Verlauf der Arbeit näher eingegangen wird.

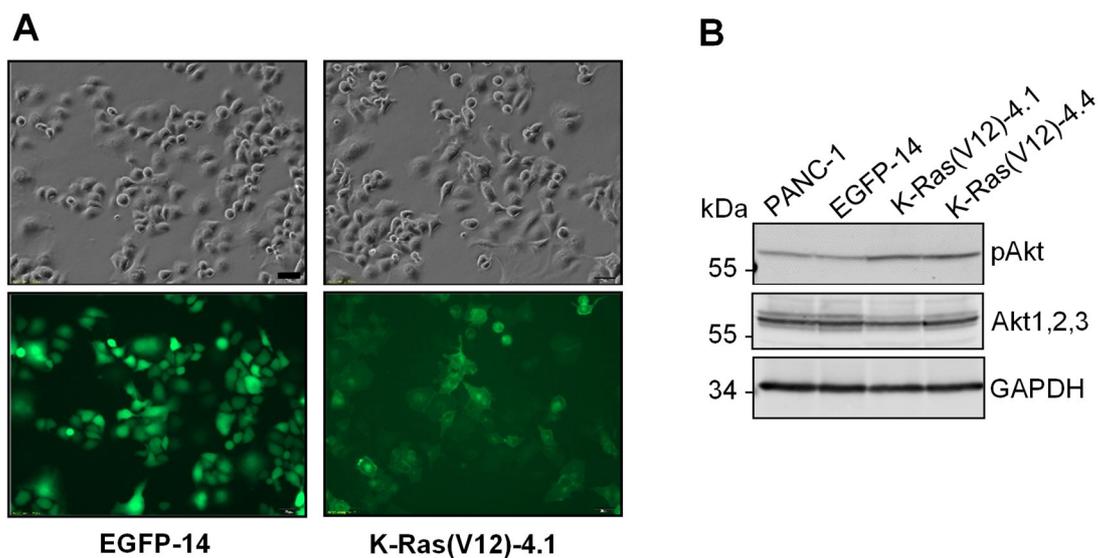


Abb. 4-1. Effekt von EGFP-K-Ras(V12) auf die Akt-Phosphorylierung. (A) Phasenkontrast- und korrespondierende Fluoreszenz-Aufnahmen von EGFP- und EGFP-K-Ras(V12)-exprimierenden PANC-1-Zellklonen. Die Fluoreszenz des EGFP-Proteins wurde bei 488 nm angeregt und einer Emission von 507 nm aufgenommen. Maßstabsbalken = 50 μ m. (B) Immunblot-Analyse des phospho-Akt und Akt1,2,3-Gehaltes in 50 μ g RIPA-Zelllysaten von konfluent gewachsenen Zellen. Es wurden PANC-1 Zellen sowie die Zellklone EGFP-14, EGFP-K-Ras(V12)-4.1 und -4.4 analysiert. Die Nachweise von phospho-Akt, Akt1,2,3 und GAPDH erfolgten jeweils mit einem spezifischen Antikörper gegen phospho-Akt (S473; #4060, Cell Signaling), einem Akt-Antikörper, der alle drei Akt-Isoformen erkennt (Akt1,2,3-Antikörper), und einem GAPDH-Antikörper sowie anschließender ECL- (nur Akt1,2,3-Nachweis) oder Fluoreszenz-Detektion. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentativer Immunblot (n = 3).

4. Ergebnisse

4.1.3 Charakterisierung Akt-isoformspezifischer Antikörper

Um die Expression der einzelnen Akt-Isoformen zu analysieren, wurden Akt-Antikörper gegen Akt1, Akt2 oder Akt3 zuerst auf ihre Isoform-Spezifität analysiert. Hierzu wurden die Akt-Isoformen aus H1299-Zelllysaten mit Akt1-, Akt2- oder Akt3-spezifischen Antikörpern präzipitiert und die Präzipitate im Immunblotverfahren mit jeweils einem isoformspezifischen Antikörper analysiert. Zur Kontrolle möglicher unspezifischer Bindungen wurde mit einem Maus-IgG2a-Antikörper präzipitiert.

In den Immunblots in Abb. 4-2 ist mit dem Akt1-, respektive Akt2-Antikörper nur eine Bande nach IP von Akt1 (Abb. 4-2A), respektive IP von Akt2 (Abb. 4-2B) detektierbar. Eine Bande auf gleicher Höhe ist ebenso im Gesamtzelllysate nachweisbar. In Abb. 4-2A-B ist zu erkennen, dass die Akt1-Bande mit ca. 60 kDa etwas höher läuft als die Akt2-Bande mit ca. 57 kDa. Es werden in diesen Immunblots weitere Banden (mit * markiert) nachgewiesen. Diese werden bei einem deutlich höheren Molekulargewicht als das bekannte Molekulargewicht der Akt-Isoformen (Akt1 = 55.7 kDa, von Akt2 = 55.8 kDa und Akt3 = 55.8 kDa; Datenbankrecherche UniProt Ref. Nr.: Akt1 = P31749; Akt2 = P31751; Akt3 = Q9Y243) detektiert und sind daher als unspezifisch einzustufen. Für den Akt3-Nachweis im Immunblot standen sowohl der Akt3-Antikörper GMA104, als auch der Akt3-Antikörper L47B1 zur Verfügung. Wurde der Akt3-Antikörper GMA104 zur Detektion verwendet (Abb. 4-2C), führt dies zu einer Bande im Bereich von 57 kDa nach Akt3-IP. Dieses Signal ist ebenso unter Verwendung des zweiten Akt3-Antikörpers detektierbar (Abb. 4-2D). Im Gesamtzelllysate kann mit beiden Akt3-Antikörpern keine Bande detektiert werden und Akt3 in diesem Lysate nicht nachgewiesen werden. Die Kontroll-IPs mit Maus-IgG2a zeigen kein Signal und somit keine unspezifische Akt3-Präzipitation. Die Immunblots in Abb. 4-2A-D zeigen in allen Spuren der IPs jeweils Banden bei 55 kDa. Hierbei handelt es sich um die schwere Kette des in der IP eingesetzten Antikörpers, der durch den Sekundärantikörper erkannt wird und vergleichbare Mengen der Antikörper in der IP nachweist. Somit können die detektierten Banden eindeutig zu der präzipitierten Akt-Isoform Akt1, Akt2 oder Akt3 zugeordnet werden und eine unspezifische Erkennung der jeweils anderen Akt-Isoformen kann ausgeschlossen werden. Immunpräzipitiertes Akt1, Akt2 oder Akt3 wurde jeweils nicht gemeinsam detektiert, kann aber mit dem Akt1,2,3-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 4-2E). Auf diesen Versuch wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Akt1-, Akt2- und Akt3-Antikörper jeweils eine Akt-Isoform spezifisch erkennen, die vorhandenen Akt3-Antikörper Akt3 im analysierten Gesamtzelllysate aber nicht nachweisen, da der Akt3-Gehalt in diesem Gesamtzelllysate zu gering ist (siehe auch Kapitel 4.2).

4. Ergebnisse

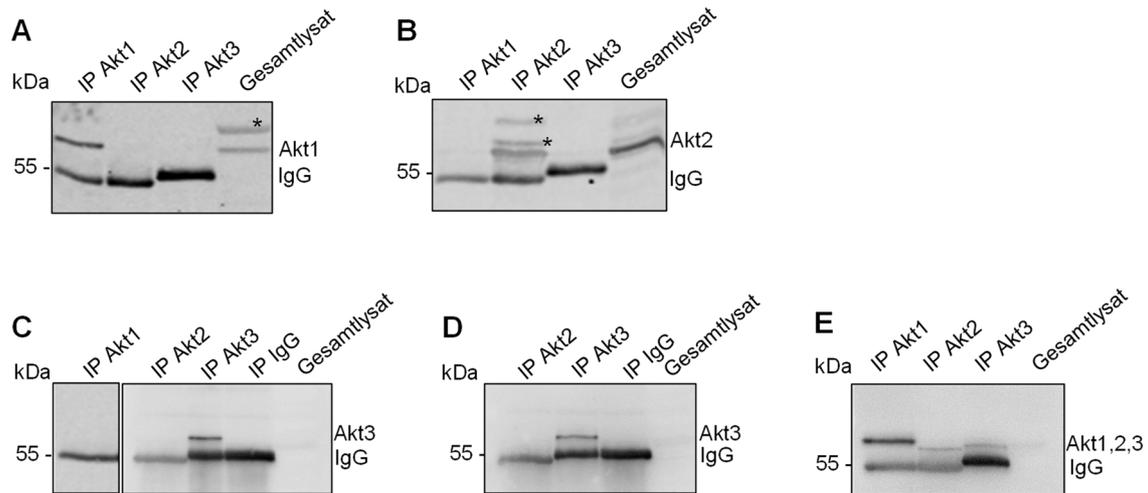


Abb. 4-2: Isoformspezifität der verwendeten Akt1-, Akt2- und Akt3-Antikörper. Es wurden je 2 μg α -Akt1 (2H10), α -Akt2 (L79B4; beide Cell Signaling), α -Akt3 (GMA104, Millipore) und zur Kontrolle Maus-IgG2a-Antikörper (IgG) an ProteinG-Agarose-*Beads* gekoppelt und anschließend mit 1000 μg H1299-Zellysate (A-D) oder 1000 μg H23-Zellysate (E) inkubiert. Die Analyse des Präzipitats und des Gesamtzellysates (50 μg) erfolgte im Immunblotverfahren mit den isoformspezifischen Akt-Antikörpern gegen Akt1, Akt2 und zwei verschiedenen Akt3-Antikörpern (GMA104, Millipore in C, L47B1 (Cell Signaling) in (D) und ECL-Detektion. In (E) erfolgte der Nachweis der drei Akt-Isoformen, mit einem Akt-Antikörper, der alle Isoformen erkennt (Akt1,2,3-Antikörper) und ECL-Detektion. * = unspezifische Bande.

Um den relativen Gehalt der einzelnen Akt-Isoformen in einem Zellysate zu analysieren, wurden Immunpräzipitationen der Akt-Isoformen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst NP-40-Zellysate von H23 Zellen und Antikörper reaktiv gegen Akt1, Akt2 oder Akt3 eingesetzt. Der Nachweis im Immunblot erfolgte in diesem Fall mit dem Akt1,2,3-Antikörper, um die präzipitierten Mengen der Akt-Isoformen direkt vergleichen zu können. Der Immunblot, dargestellt in Abb. 4-2E, zeigt Banden zwischen 57-60 kDa, die je einer Akt-Isoform zugeordnet werden können. Die Bande für Akt1 läuft bei ca. 60 kDa und ist deutlich stärker als die Signale von Akt2 und Akt3. Die Akt2-Bande läuft auf Höhe von ca. 57 kDa und das Signal von Akt3 zeigt sich zwischen den Banden für Akt1 und Akt2 bei ca. 58 kDa. Aufgrund der fast gleichen Laufhöhen der Akt-Isoformen ist im Gesamtzellysate keine eindeutige Zuordnung der Signale für die Isoformen Akt2 und Akt3 möglich. Akt1 kann eindeutig zugeordnet werden, da dieses Signal leicht höher detektiert wird (siehe hierzu auch Kapitel 4.2). Der Immunblot zeigt auch, dass Akt1 in H23 Zellen um das 3-4-fache stärker exprimiert wird als Akt2 und Akt3 (siehe ebenso Kapitel 4.5).

4. Ergebnisse

4.1.4 Effekt von EGFP-K-Ras(V12) auf die Expression der Akt-Isoformen

Um zu klären, ob die stabile Expression von onkogenem K-Ras einen Einfluss auf die Proteinexpression der Akt-Isoformen hat, wurde der Gehalt der Akt-Isoformen in RIPA-Zelllysaten der PANC-1-Klone EGFP-K-Ras(V12)-4.1 und -4.4 im Vergleich zu parentalen PANC-1 Zellen, dem Klon EGFP-14 und einem Klon der dominant-negatives EGFP-K-Ras(N17) exprimiert im Immunblotverfahren mit isoformspezifischen Akt-Antikörpern analysiert. Repräsentative Immunblots sind in Abb. 4-3 dargestellt. In Abb. 4-3A ist zu erkennen, dass die Akt1-Expression in den EGFP-K-Ras(V12)-Klonen -4.1 und -4.4 im Vergleich zu den Kontrollzellen um das 2-3-fache vermindert ist. Die Akt2-Expression ist zwischen den analysierten Zelllinien nicht erkennbar verändert. Die Akt3-Expression ist im EGFP-K-Ras(V12)-Klon -4.1 und -4.4 im Vergleich zu parentalen PANC-1 Zellen und dem EGFP-Klon 5-6-fach erhöht. Im Klon mit EGFP-K-Ras(N17)-Expression ist im Vergleich zu parentalen PANC-1 Zellen keine Veränderung des Gehaltes der einzelnen Akt-Isoformen nachweisbar. Der Nachweis des Akt-Gesamtgehaltes zeigt in den EGFP-K-Ras(V12)-Klonen eine leicht geringere Menge als in den parentalen Zellen.

Um die Proteinexpression der Akt-Isoformen in den EGFP-K-Ras(V12)-Zellklonen mit der mRNA-Expression der *AKT*-Varianten zu vergleichen, wurde RNA konfluent gewachsener Zellen in cDNA umgeschrieben und mittels einer qPCR-Analyse mit spezifischen Primern für die *AKT*-Varianten und als endogene Referenz mit dem *Housekeeping*-Gen *RPLP0* analysiert. Als Kontrolle dienten PANC-1 Zellen und drei verschiedene EGFP-Zellklone. Die Versuche wurden von Jens Bier, AG Prof. Dr. Giehl, durchgeführt. Die relative Expressionsmenge der *AKT*-mRNA-Varianten, welche mit der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Methode ermittelt wurde, ist im Balkendiagramm als Mittelwert \pm SD in Abb. 4-3B abgebildet. Die Auswertung zeigt, dass in den EGFP-K-Ras(V12)-Klonen -4.1 und -4.4 eine um das 9-fach bzw. 15-fach gesteigerte Expression von *AKT3* im Vergleich zu PANC-1 Zellen vorliegt. Die Expression von *AKT1* ist in den EGFP-K-Ras(V12)-Klonen -4.1 und -4.4 mit 0.1 ± 0.01 -fach (SD; n = 3), respektive 0.1 ± 0.001 -fach (SD; n = 3) und *AKT2* mit 0.3 ± 0.1 -fach (SD; n = 3), respektive 0.3 ± 0.08 -fach (SD; n = 3) im Vergleich zu PANC-1 Zellen stark vermindert. In den EGFP-Klonen tritt im Vergleich zu PANC-1 Zellen eine leicht erhöhte Expression von *AKT3* auf. Diese ist um den Faktor 3 ± 0.002 (SD; n = 5) erhöht. Hierbei handelt es sich vermutlich um einen klonalen Effekt, da sowohl eine reduzierte, als auch eine erhöhte Akt3-Proteinexpression in den analysierten EGFP-Klonen nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die *AKT1*- und *AKT2*-Expression ist in den EGFP-Klonen mit 2.1 ± 2.37 -fach (SD; n = 4) im Vergleich zu PANC-1 Zellen mit 1.3 ± 0.4 -fach (SD; n = 6) unverändert und weist nach, dass die EGFP-Expression keinen Effekt auf die *AKT1*- und *AKT2*-Expression zeigt.

4. Ergebnisse

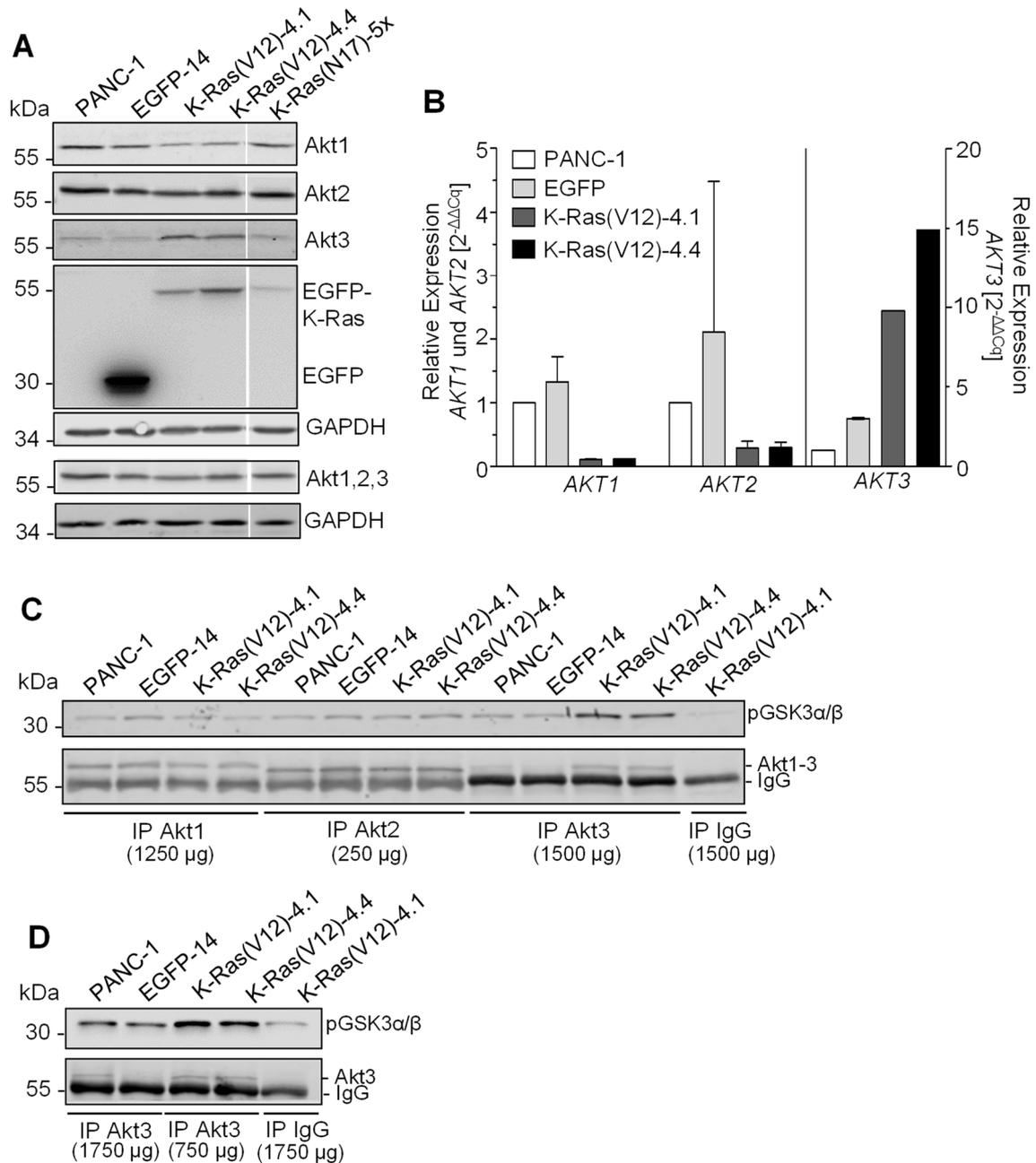


Abb. 4-3. Der Einfluss von EGFP-K-Ras(V12) auf die Expression und Aktivität der Akt-Isoformen. (A) Immunblot-Analysen der Akt1-, Akt2- und Akt3-Expression in 50 µg RIPA-Zellysaten von konfluent gewachsenen Zellen. Es wurden PANC-1 Zellen sowie die Klone EGFP-14, EGFP-K-Ras(V12)-4.1 und -4.4 sowie EGFP-K-Ras(N17)-5x analysiert. Die Detektion der Akt-Isoformen erfolgte mit isoform-spezifischen Akt-Antikörpern und einem Akt1,2,3-Antikörper sowie ECL- oder Fluoreszenz-Detektion. EGFP-K-Ras- und EGFP-Proteine wurden mit einem GFP-spezifischen Antikörper und ECL-Detektion nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde GAPDH mit einem spezifischen GAPDH-Antikörper und Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen (n = 5; n = 2 für K-Ras(N17)). (B) qPCR-Analyse der mRNA-Expression der *AKT*-mRNA-Varianten in PANC-1 Zellen, drei EGFP-Klonen und zwei EGFP-K-Ras(V12)-Klonen. Die qPCRs wurden mit spezifischen Primern für *AKT1*, *AKT2* und *AKT3* und für das Referenz-Gen *RPLP0* durchgeführt. Die relative Genexpression wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Methode ermittelt, bezogen auf die Expression von *RPLP0*. Die relative Genexpression ist als Mittelwert \pm SD (n = 3-5) angegeben.

4. Ergebnisse

(C,D) Immunblot-Analyse von isoformspezifischen *in vitro* Akt-Kinase-Assays, die mit Lysaten der Zelllinie PANC-1 und der Klone EGFP-14, EGFP-K-Ras(V12)-4.1 und -4.4 durchgeführt wurden. Die Zellen wurden 20 h in DMEM ohne Zusätze kultiviert und in NP-40-Lysepuffer lysiert. Um gleiche Mengen der Akt-Isoformen zu präzipitieren, wurden die in der IP eingesetzten Lysatmengen angeglichen. Zur Kontrolle wurde mit einem Maus-IgG2a-Antikörper präzipitiert. Die Phosphorylierung der GSK3 α / β -GST und die Menge der präzipitierten Akt-Isoformen wurde im Immunblotverfahren durch Verwendung von spezifischen Antikörpern reaktiv gegen pGSK3 α / β (S21/9; #9327, Cell Signaling) und Akt1,2,3 sowie Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Der Nachweis von IgG diente als Kontrolle der in der IP eingesetzten Antikörpermenge (n = 3).

4.1.5 Effekt von onkogenem K-Ras(V12) auf die Kinase-Aktivität der Akt-Isoformen

Um nun den Effekt der EGFP-K-Ras(V12)-Expression auf die basale Aktivität der einzelnen Akt-Isoformen zu analysieren, wurden Akt-Kinase-Assays durchgeführt. Dazu wurden subkonfluent gewachsene Zellen der Klone EGFP-K-Ras(V12)-4.1 und EGFP-K-Ras(V12)-4.4, EGFP-14 sowie PANC-1 Zellen über Nacht in DMEM ohne Zusätze kultiviert, NP-40-Lysate hergestellt und diese im Akt-Kinase-Assay mit anschließendem Immunblotverfahren analysiert (Etablierung des Assays siehe Kapitel 4.5).

Die Akt-Isoformen wurden in dem Assay mit den isoformspezifischen Antikörpern präzipitiert und anschließend mit dem Akt-Substrat GSK3 α / β -GST-Fusionsprotein (GSK3 α / β -GST) inkubiert. In dem Assay wurde die Menge an eingesetztem Lysat auf die Akt-Isoform-Expression in PANC-1 Zellen angeglichen. Der Nachweis von Akt1, Akt2 und Akt3 in Abb. 4-3C (Immunblot unten) zeigt, dass aus den Lysaten der EGFP-K-Ras(V12)-Klone deutlich weniger Akt1, die etwa gleiche Menge Akt2 und eine deutlich höhere Akt3-Menge im Vergleich zu PANC-1 Zellen oder dem EGFP-14-Klon präzipitiert werden. Densitometrische Analysen der präzipitierten Mengen wiesen eine $\frac{1}{4}$ geringere Akt1-Menge in den EGFP-K-Ras(V12)-Klonen im Vergleich zu PANC-1 und EGFP-14 Zellen sowie eine 1.5-2-fach präzipitierte Akt3-Menge in den EGFP-K-Ras(V12)-Klonen nach. Dies bestätigt den zuvor festgestellten, verminderten Akt1- und erhöhten Akt3-Gehalt in den EGFP-K-Ras(V12)-Klonen. Die Kinase-Aktivität der einzelnen Akt-Isoformen ist im oberen Immunblot in Abb. 4-3C durch den Nachweis der phosphorylierten Form des GSK3 α / β -GST dargestellt. In EGFP-K-Ras(V12)-4.1 und EGFP-K-Ras(V12)-4.4 Zellen ist im Vergleich zu PANC-1 Zellen und dem EGFP-14-Klon kein Unterschied in der Akt1- oder Akt2-Aktivität erkennbar. Die Akt3-Kinase-Aktivität ist in den beiden EGFP-K-Ras(V12)-Klonen deutlich (2-3-fach) höher als in PANC-1 Zellen. Um zu überprüfen, ob die festgestellte, erhöhte Akt3-Aktivität auf die erhöhten präzipitierten Akt3-Mengen zurückzuführen sind, wurden in zwei weiteren Assays gleiche Mengen Akt3-Protein aus den Lysaten präzipitiert und die Kinase-Aktivität wie zuvor analysiert.

4. Ergebnisse

Der repräsentative Immunblot in Abb. 4-3D zeigt, dass bei vergleichbaren, präzipitierten Akt3-Mengen aus PANC-1- oder EGFP-K-Ras(V12)-4-1- bzw. -4-4-Zelllysaten (Immunblot oben) eine 2-3-fach erhöhte GSK3 α / β -GST-Phosphorylierung in den EGFP-K-Ras(V12)-Klonen im Vergleich zu PANC-1 Zellen nachweisbar ist. Somit ist die Akt3-Aktivität unabhängig von der erhöhten Akt3-Expression in den EGFP-K-Ras(V12)-Klonen deutlich stärker als in den Kontrollzellen.

Zusammenfassend konnte sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene eine erhöhte Akt3-Expression nach stabiler Expression von EGFP-K-Ras(V12) in PANC-1 Zellen detektiert werden. Weiterhin zeigte sich eine verminderte *AKT1*- und *AKT2*-Expression nach stabiler Expression von EGFP-K-Ras(V12), die für Akt1 deutlich auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte. Die vorgestellten Akt-Kinase-Assays wiesen eine erhöhte Akt3-Kinase-Aktivität in den EGFP-K-Ras(V12)-exprimierenden PANC-1 Zellen nach.

4.2 Expression der Akt-Isoformen in etablierten Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien

4.2.1 Analyse des *KRAS*-Mutationsstatus

Aufbauend auf der Erkenntnis, dass die stabile Expression von EGFP-K-Ras(V12) in PANC-1 Zellen die Expression der Akt-Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 beeinflusst (siehe Kapitel 4.1), sollte der Akt1-, Akt2- und Akt3-Gehalt in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien mit mono- oder bi-allelischer *KRAS*-Mutation im Kodon 12 sowie auch in Zelllinien mit Expression von wildtypischem K-Ras untersucht werden. Ebenso stand für die Analysen die immortalisierte epitheliale duktaale Pankreaszelllinie H6c7 zur Verfügung, welche als nicht-tumorigene Referenz genutzt wurde.

Um zunächst den *KRAS*-Mutationsstatus etablierter Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien zu ermitteln, wurde eine Datenbankrecherche mithilfe des TRON *cell line portals*, ATCC oder der COSMIC-Datenbank sowie eine Literaturrecherche durchgeführt. Die Übersicht der Recherche mit Angabe der relevanten Literatur ist Tabelle 4-1 zu entnehmen. Die Datenbank-Recherche ergab, dass die Zelllinien COLO-699, HTB-55, H1299, H1688, BxPC-3 und die epitheliale duktaale Pankreaszelllinie H6c7 wildtypische *KRAS*-Allele besitzen, während die anderen Zelllinien homo- oder heterozygote Mutationen im Kodon 12 aufweisen.

4. Ergebnisse

Tabelle 4-1. Zusammenfassung des *KRAS*-Mutationsstatus. Dargestellt sind das Ursprungsgewebe, der Tumortyp, der *KRAS*-Mutationsstatus (ermittelt durch Datenbank-Recherche) verschiedener Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien und der immortalisierten epithelialen duktaalen Pankreaszelllinie H6c7. NSCLC = *Non-small cell lung cancer*, SCLC = *Small cell lung cancer*, mt = mutiert, wt = Wildtyp, (+/-) = heterozygote Mutation, (-/-) = homozygote Mutation. Datenbank-Recherche mithilfe des TRON *cell line portal*^A [102], COSMIC Datenbank [103]^B und Angaben von ATCC^C.

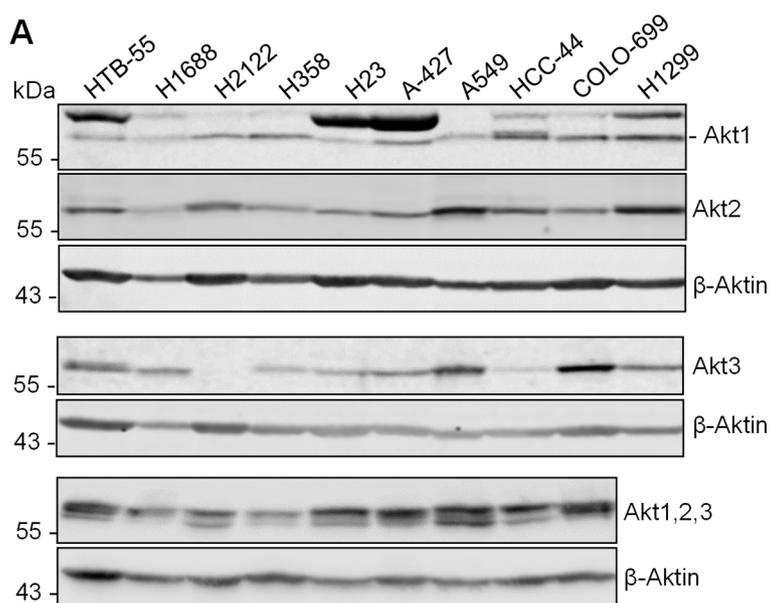
Zelllinie	Ursprungsgewebe	Tumortyp	<i>KRAS</i> Mutationsstatus; [relevante Literatur]
A-427	Lunge	Karzinom	mt (G12D ^{+/-}); [104]
A549	Lunge	Karzinom	mt (G12S ^{-/-}); [104]
COLO-699	Lunge; Metastase (Pleuraerguss)	Adenokarzinom	wt ^B
H1299	Lunge; Metastase (Lymphknoten)	Karzinom; NSCLC	wt ^B
H1688	Lunge; Metastase (Leber)	Karzinom; SCLC	wt ^C
H23	Lunge	Adenokarzinom; NSCLC	mt (G12C ^{+/-}); [105]
H2122	Lunge; Metastase (Pleuraerguss)	Adenokarzinom; NSCLC	mt (G12C ^{-/-}) ^C
H358	Lunge; Metastase (Alveole)	Bronchoalveolar-karzinom; NSCLC	mt (G12C ^{+/-}) ^C
HCC-44	Lunge	Adenokarzinom	mt (G12C ^{+/-}) ^A
HTB-55	Lunge; Metastase (Pleuraerguss)	Adenokarzinom	wt ^C
AsPC-1	Pankreas; Metastase (Aszites)	Adenokarzinom	mt (G12V ^{-/-}); [106]
BxPC-3	Pankreas	Adenokarzinom	wt; [107]
Capan-1	Pankreas; Metastase (Leber)	Adenokarzinom	mt (G12V); [108]
Capan-2	Pankreas	Adenokarzinom	mt (G12V); [108]
COLO 357	Pankreas; Metastase (Lymphknoten)	Adenokarzinom	mt (G12D) ^B
H6c7	Pankreas	-	wt; [109]
MIA PaCa-2	Pankreas	Adenokarzinom	mt (G12C ^{-/-}); [110]
PANC-1	Pankreas	Adenokarzinom	mt (G12D ^{+/-}) [107]
PaTu 8988s	Pankreas; Metastase (Leber)	Adenokarzinom	mt (G12V) ^A
PaTu 8988t	Pankreas; Metastase (Leber)	Adenokarzinom	mt (G12V) ^A
PaTu 8902	Pankreas	Adenokarzinom	mt (G12V) ^A

4. Ergebnisse

4.2.2 Proteinexpression der Akt-Isoformen

Um die Proteinexpression der Akt-Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 in den etablierten Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien zu untersuchen, wurden RIPA-Zelllysate mit den isoform-spezifischen Akt-Antikörpern und dem Akt1,2,3-Antikörper im Immunblotverfahren analysiert. Zur Quantifizierung des relativen Gehaltes von Akt1, Akt2 und Akt3 wurden die Banden mittels Densitometrie vermessen und die Signalstärke in Relation zum β -Aktin- oder GAPDH-Gehalt berechnet.

Die Immunblots in Abb. 4-4 zeigen exemplarisch die Expression der drei Akt-Isoformen in Lungen- (A) und Pankreaskarzinomzelllinien (B). Die Analyse der Lungenkrebszelllinien zeigt, dass Akt1 differentiell exprimiert wird. HTB-55 (*KRAS* wt), H2122, A427 und H23 Zellen (alle *KRAS* mt) exprimieren im Vergleich der Zelllinien die geringste Akt1-Menge. A549 (*KRAS* mt) und COLO-699 Zellen (*KRAS* wt) zeigen eine moderate Akt1-Expression, während HCC-44, H358 (beide *KRAS* mt) als auch H1299 Zellen (*KRAS* wt) im Vergleich zu HTB-55 Zellen eine starke Expression aufweisen. Akt2 wird in diesen Zelllinien ebenso differentiell, aber in stark unterschiedlicher Menge exprimiert. H23 und COLO-699 Zellen weisen dabei im Vergleich aller Zelllinien die geringste Akt2-Menge auf. A549 und H1299 Zellen exprimieren Akt2 um das 4-5-fache stärker als H23 Zellen. Die weiteren Zelllinien exprimieren im Vergleich zu H23 Zellen die doppelte Akt2-Menge. Die Isoform Akt3 ist einzig in H2122 Zellen nicht nachweisbar, während HCC-44, H23 und H358 Zellen Akt3 in geringer Menge exprimieren. In A549, COLO-699 als auch H1299 und H1688 Zellen ist ein hoher Akt3-Gehalt (3-4-fach) im Vergleich zu gering exprimierenden Zelllinien nachweisbar.



4. Ergebnisse

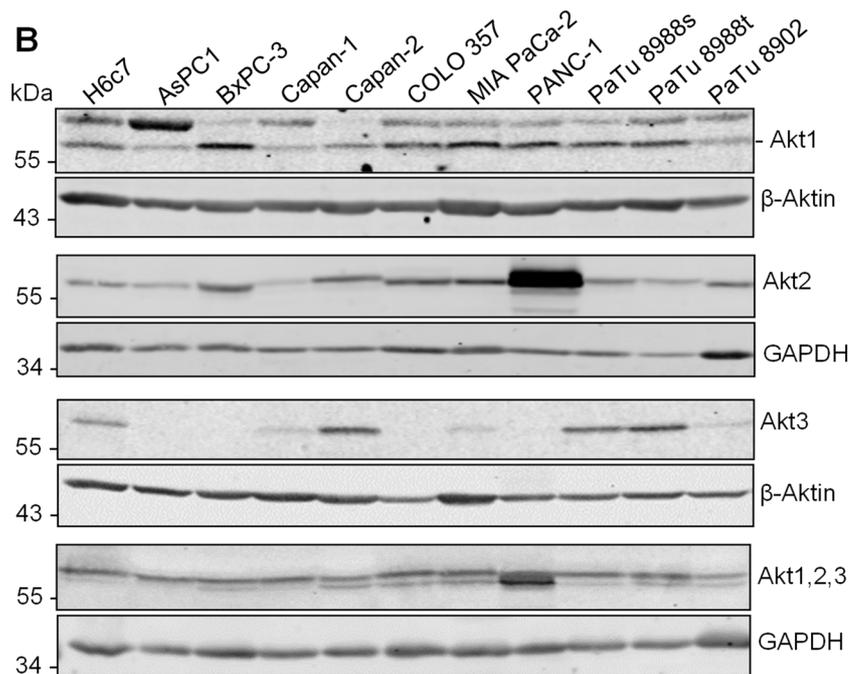


Abb. 4-4. Proteinexpression der Akt-Isoformen in verschiedenen Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien. Immunblot-Analysen des Akt1-, Akt2- und Akt3- sowie des Gesamt-Akt-Gehaltes in 50 µg RIPA-Zelllysaten von etablierten Lungen (A)- und Pankreaskarzinomzelllinien (B) sowie der immortalisierten, epithelialen duktaalen Pankreaszelllinie H6c7 (B). Die Lysate wurden aus konfluent gewachsenen Zellen hergestellt. Die drei Akt-Isoformen wurden separat durch die isoformenspezifischen Antikörper gegen Akt1 (2H10), Akt2 (D6G4) und Akt3 (L47B1) detektiert und durch einen Akt-Antikörper, der alle Isoformen erkennt (Akt1,2,3-Antikörper) sowie ECL- (nur Akt1,2,3-Nachweis) oder Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurden β-Aktin oder GAPDH mit spezifischen Antikörpern gegen β-Aktin oder GAPDH und anschließender Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen (n ≥ 3).

Im Vergleich der analysierten Pankreaskarzinomzelllinien mit H6c7 Zellen zeigt sich ebenfalls eine unterschiedliche Expression. H6c7 (*KRAS* wt) und Capan-1 Zellen (*KRAS* mt) zeigen die geringste Akt1-Expression. Die weiteren analysierten Zelllinien exprimieren im Vergleich dazu mindestens die doppelte Menge an Akt1. Akt2 ist ebenso in allen Zelllinien in unterschiedlicher Menge nachweisbar. Im Vergleich zu H6c7 Zellen und zu den anderen Pankreaskarzinomzelllinien weist die Zelllinie PANC-1 eine starke Überexpression von Akt2 auf, die mindestens 15-fach höher ausfällt. Eine moderat erhöhte Akt2-Expression (4-5-fach) kann in BxPC-3 (*KRAS* wt) und COLO 357 (*KRAS* mt) Zellen im Vergleich zu H6c7 Zellen nachgewiesen werden, welche Akt2 geringer exprimieren. Akt3 ist in den Zelllinien H6c7, Capan-1, MIA PaCa-2, PaTu 8988s (beide *KRAS* mt) sowie in PaTu 8902 Zellen (*KRAS* mt) in geringer Menge nachweisbar; Capan-2 und PaTu 8988t Zellen exprimieren im Vergleich zu H6c7 Zellen 2-3-fach mehr Akt3. In den Zelllinien AsPc1 (*KRAS* mt), BxPC-3, COLO 357 und PANC-1 ist Akt3 nicht detektierbar. In PANC-1 Zellen kann Akt3 im direkten Vergleich der Zelllinien nicht detektiert werden, da die Expression zu gering ausfällt.

4. Ergebnisse

Nach Immunpräzipitation kann Akt3 aber nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.1 und 4.5). In COLO 357 und H2122 Zellen kann Akt3 nach Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) und wird vermutlich nicht exprimiert.

Der Nachweis der drei Akt-Isoformen mit dem Akt1,2,3-Antikörper in Abb. 4-4A,B zeigt sowohl in den analysierten Pankreaskarzinomzelllinien als auch in den Lungenkarzinomzelllinien ein Bandenmuster mit zwei – oder wie in HTB-55 und A549 Zellen – mit 3 Banden. Bei der oberen Bande handelt es sich um Akt1 (wie in Kapitel 4.1 gezeigt). Bei den beiden untersten Banden handelt es sich entweder um Akt2 oder Akt3. Eine exakte Zuordnung der unteren Bande bzw. der unteren beiden Banden zu Akt2 oder Akt3 ist mit diesem Antikörper nicht möglich (siehe dazu ebenso Kapitel 4.1). Um die Expressionsmengen der Akt-Isoformen innerhalb einer Zelllinie direkt miteinander zu vergleichen, wurden Immunpräzipitationen von Akt1, Akt2 und Akt3 aus Lysaten ausgewählter Zelllinien durchgeführt. Diese werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit detailliert beschrieben (siehe Kapitel 4.5).

4.2.3 Expression der *AKT*-Varianten auf mRNA-Ebene

Um die Proteinexpression der Akt-Isoformen mit der Expression der *AKT*-mRNA-Varianten zu vergleichen, wurden die Zelllinien H23, HCC-44, COLO-699, H1299, COLO 357, MIA PaCa-2 und PANC-1 aufgrund ihrer unterschiedlichen Proteinexpression der Akt-Isoformen zur Analyse ausgewählt. Für die Analyse wurde RNA konfluent gewachsener Zellen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die Expression von *AKT1*, *AKT2* und *AKT3* mittels qPCR, wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben, analysiert. Diese Versuche wurden von Jens Bier, AG Prof. Dr. Giehl, durchgeführt.

Die relative Expressionsmenge der *AKT*-Varianten ist in Abb. 4-5 in Balkendiagrammen als Mittelwert \pm SD, bezogen auf die Expression des *Housekeeping*-Gens *RPLP0*, dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit der $2^{-\Delta C_q}$ -Methode. In H23, HCC-44 und COLO-699 Zellen kann mit 3.7 ± 1.9 (SD; n = 5) bzw. 4 ± 3.3 (SD; n = 5) und 4.1 ± 3.7 (SD; n = 4) ein vergleichbarer, moderater *AKT1*-Gehalt ermittelt werden. In H1299 Zellen wird *AKT1* mit 7.8 ± 2.9 (SD; n = 4), in MIA PaCa-2 mit 5.6 ± 0.9 (SD; n = 3) und in PANC-1 mit 6.4 ± 1.8 (SD; n = 4) deutlich stärker exprimiert. In COLO 357 Zellen ist *AKT1* mit 2.9 ± 1.1 (SD; n = 4) am geringsten exprimiert. Die Auswertung der *AKT2*-mRNA-Expression ergibt, dass H23 (1.1 ± 0.4 , SD; n = 5), HCC-44 (1.4 ± 0.5 SD; n = 5), COLO 357 (0.8 ± 0.2 SD; n = 4), MIA PaCa-2 (1.9 ± 0.6 , SD; n = 3) und COLO-699 Zellen (0.56 ± 0.3 SD; n = 4) eine moderate *AKT2*-Expression aufweisen. H1299 Zellen exprimieren nicht nur viel *AKT1*, sondern mit 5.1 ± 0.9 (SD; n = 4) auch viel *AKT2*. Der schon im Immunblot detektierte, hohe Akt2-Gehalt ist in PANC-1 Zellen mit 29.6 ± 16.7 (SD; n = 4) auch auf mRNA-Ebene nachweisbar. Die *AKT3*-mRNA ist in den analysierten Zelllinien in stark unterschiedlicher Menge vorhanden.

4. Ergebnisse

COLO-699 und H1299 Zellen exprimieren mit 0.004 ± 0.003 (SD; $n = 4$) und 0.044 ± 0.08 (SD; $n = 4$) die höchste relative *AKT3*-Menge, während H23 und HCC-44 Zellen mit 0.002 ± 0.001 (SD; $n = 5$) und 0.001 ± 0.001 (SD; $n = 5$) eine moderate *AKT3*-Menge aufweisen. In PANC-1 Zellen ist mit 0.0003 ± 0.0002 (SD; $n = 4$) der geringste *AKT3*-Gehalt messbar, während *AKT3* in COLO 357 Zellen nicht detektiert wird ($n = 4$) und dies die Ergebnisse der Protein-Expressionsanalyse bestätigt.

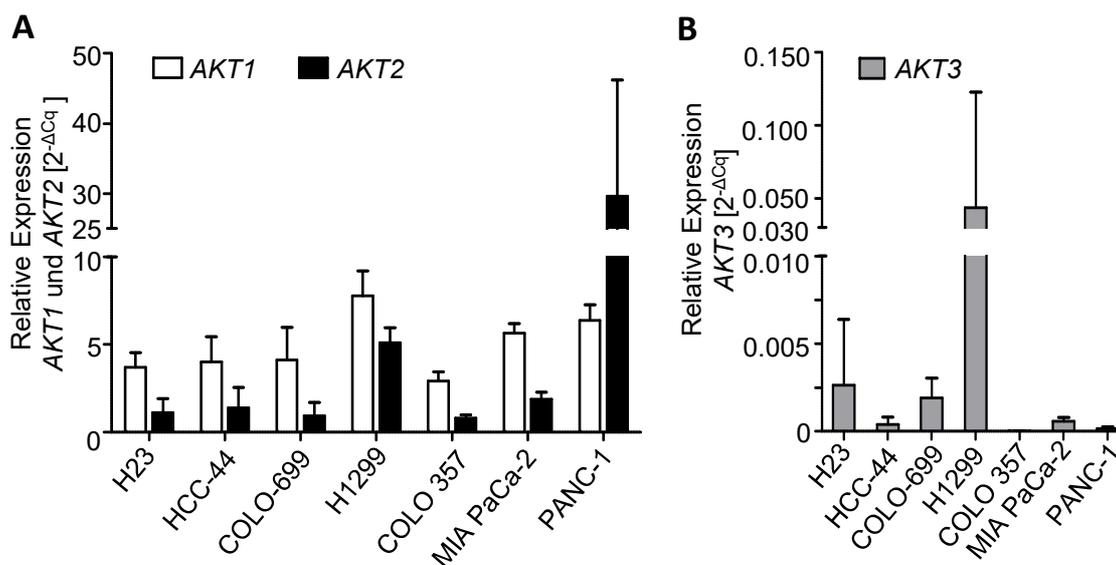


Abb. 4-5. Die Expression der *AKT*-mRNA-Varianten in ausgewählten Lungen- und Pankreas-karzinomzelllinien. qPCR-Analyse der mRNA-Expression der *AKT*-Varianten *AKT1*, *AKT2* (A) und *AKT3* (B) in den Lungenkarzinomzelllinien H23, HCC-44, COLO-699 und H1299 sowie in den Pankreas-karzinomzelllinien COLO 357, MIA PaCa-2 und PANC-1. Die qPCRs wurden mit spezifischen Primern für *AKT1*, *AKT2* oder *AKT3* und für das Referenz-Gen *RPLP0* durchgeführt. Die relative Genexpression wurde mittels der $2^{-\Delta Cq}$ -Methode, bezogen auf das *Housekeeping*-Gen *RPLP0*, ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Genexpression \pm SD ($n = 3-5$).

Insgesamt zeigen die Analysen eine Zelllinien-abhängige, differentielle Expression von Akt1, Akt2 und Akt3. Dabei ist erkennbar, dass PANC-1 Zellen Akt2 stark überexprimieren und Akt3 in fast allen Lungenkarzinomzellen nachgewiesen werden kann. Die Proteinexpression der Akt-Isoformen stimmt mit der mRNA-Expression der *AKT*-Varianten in etwa überein.

4.3 Charakterisierung des Phänotyps und Expressionsanalyse verschiedener EMT-Marker-Proteine

Um die etablierten Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien grundlegend zu charakterisieren, wurden zuerst Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellen angefertigt und deren Phänotyp bestimmt. Die Zellen wurden anschließend anhand charakteristischer Merkmale in einen epithelialen, mesenchymalen oder gemischten Phänotyp aus epithelialen und mesenchymalen Zellen eingeteilt. In den Phasenkontrast-Aufnahmen in Abb. 4-6 sind ausgewählte Zelllinien aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie gezeigt. HCC-44 und COLO-699 Zellen sind fibroblasten-artig ausgebreitet und bilden keinen festen Zellverband aus. Somit sind diese Zellen dem mesenchymalen Phänotyp zuzuordnen. H23 Zellen sind heterogen in ihrer Morphologie. Manche Zellen sind fibroblasten-artig ausgebreitet, andere weisen eine polygonale Erscheinung auf. Somit wurden diese dem gemischten Phänotyp zugeteilt. HTB-55 und COLO 357 Zellen bilden sehr dichte Zellverbände aus. PANC-1 Zellen sind polygonal und zeigen ebenso eine starke Vernetzung der Zellen untereinander. Deshalb ergibt sich für diese Zellen ein epithelialer Phänotyp.

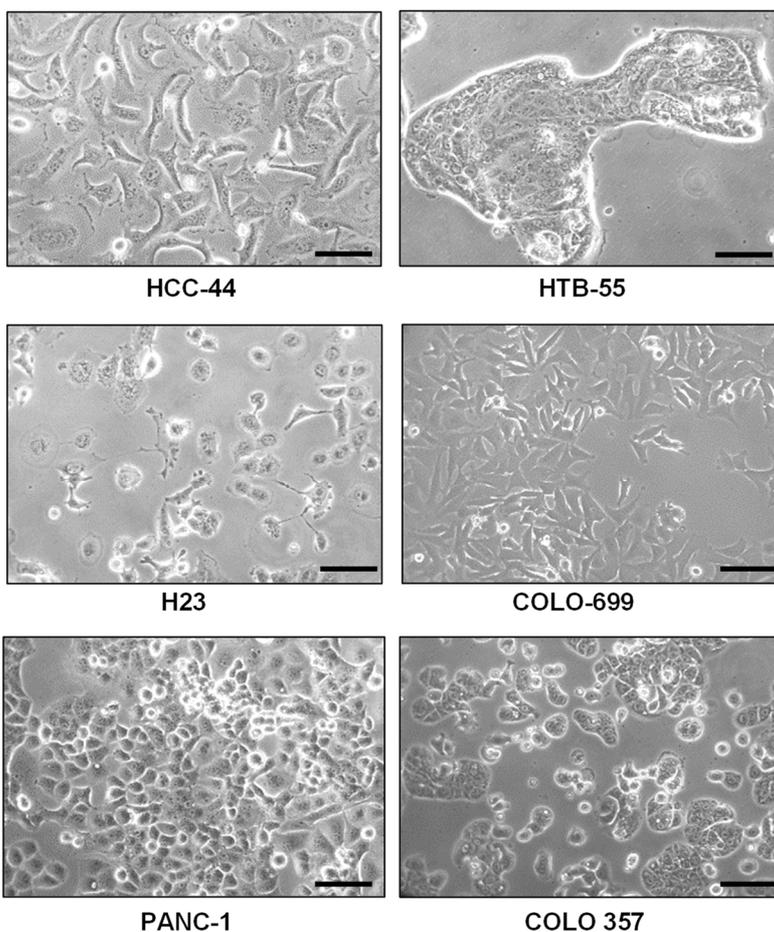


Abb. 4-6. Zellmorphologie verschiedener Zelllinien. Phasenkontrast-Aufnahmen der Lungenkarzinomzelllinien HCC-44, HTB-55, H23 und COLO-699 sowie der Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1 und COLO 357 (Maßstabsbalken = 100 µm).

4. Ergebnisse

Zur weiteren Charakterisierung der etablierten Zelllinien wurde in den folgenden Analysen die Expression von E-Cadherin, β -Catenin, Vimentin und des Aktin-stabilisierenden Proteins Girdin in RIPA-Zelllysaten im Immunblotverfahren mit spezifischen Antikörpern untersucht. Die Immunblots in Abb. 4-7A zeigen, dass E-Cadherin in HTB-55, H1688 und H358 stark exprimiert wird, während H23, A-427 und A549 Zellen E-Cadherin in geringerer Menge enthalten (siehe Abb. 4-7A). HCC-44 und COLO-699 Zellen exprimieren kaum E-Cadherin, aber Vimentin ist in diesen Zellen und auch in H23, A-427 und COLO-699 Zellen in hoher Menge nachweisbar. In HTB-55, H1688 und H358 Zellen ist Vimentin nicht nachweisbar.

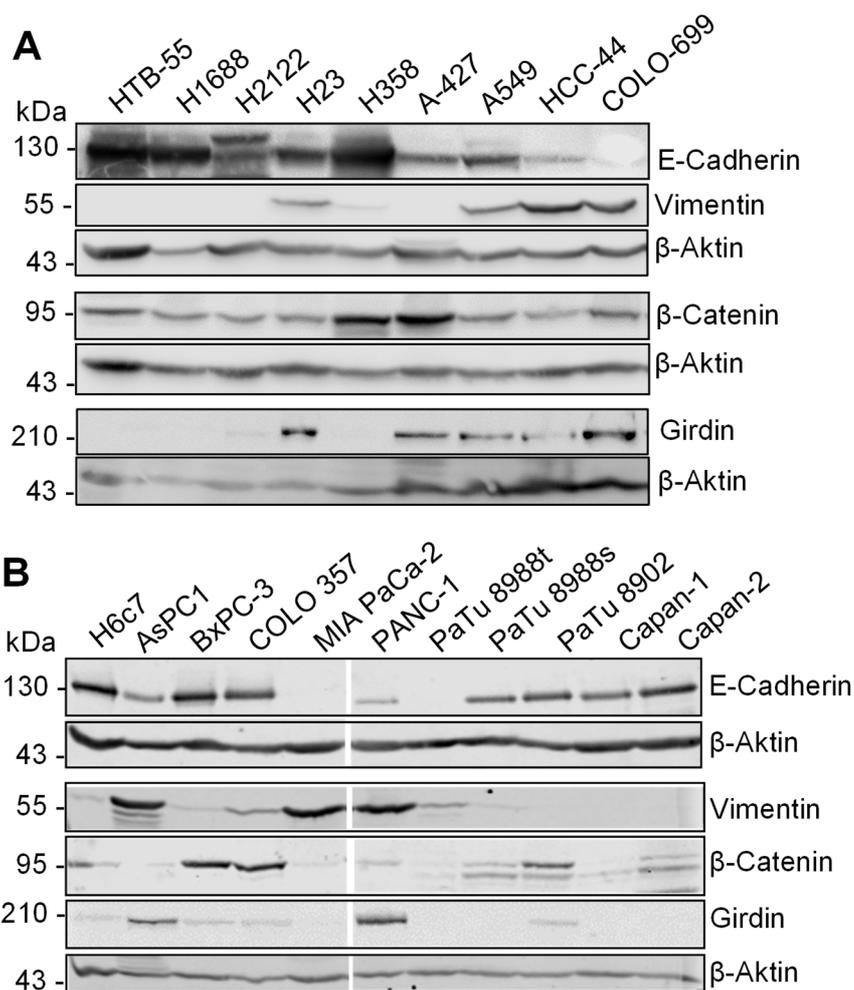


Abb. 4-7. Expression von EMT-Markerproteinen und Girdin in etablierten Lungen- und Pankreas-karzinomzelllinien. Dargestellt sind jeweils repräsentative Immunblot-Analysen der E-Cadherin-, Vimentin-, β -Catenin- und Girdin-Expression in 50 μ g RIPA-Zelllysate von zehn Lungen- (A) und zehn Pankreaskarzinomzelllinien (B) sowie der immortalisierten epithelialen duktaalen Pankreaszelllinie H6c7 (B). Die Lysate wurden aus konfluent gewachsenen Zellen hergestellt und im Immunblotverfahren analysiert. Für den Proteinnachweis wurden spezifische Antikörper reaktiv gegen E-Cadherin, Vimentin, β -Catenin und Girdin sowie ECL- (nur E-Cadherin-Nachweis) oder Fluoreszenz-Detektion verwendet. Als Ladekontrolle wurde mittels eines anti- β -Aktin-Antikörpers und anschließender Fluoreszenzdetektion der β -Aktin-Gehalt detektiert (n = 3).

4. Ergebnisse

Das Protein β -Catenin ist in den Zelllinien H23, A-427, A549, HCC-44 und COLO-699 in moderater Menge nachweisbar. Girdin ist in HTB-55, H1688, H2122 und H358 Zellen nicht nachweisbar, während H23, A-427, A549, HCC-44 und COLO-699 einen moderaten Girdin-Gehalt aufweisen.

Die Immunblot-Analysen der Pankreaskarzinomzelllinien zeigen (Abb. 4-7B), dass H6c7 Zellen sowohl Vimentin, E-Cadherin, als auch β -Catenin in moderater Menge exprimieren. In den Pankreaskarzinomzelllinien zeigt sich E-Cadherin in etwa gleich stark, wie in H6c7 Zellen exprimiert, mit Ausnahme der Zelllinien MIA PaCa-2 und PaTu 8988t, in denen kein E-Cadherin nachweisbar ist. Vimentin ist in AsPC1, MIA PaCa-2 und PANC-1 Zellen im Vergleich zu H6c7 Zellen viel stärker exprimiert. Nicht nachweisbar ist Vimentin hingegen in BxPC-3, PaTu 8902, Capan-1 und Capan-2 Zellen. Die β -Catenin-Detektion zeigt in allen Zelllinien einen Nachweis, der unterschiedlich stark ausfällt. Das Protein Girdin ist nur in einem Teil der Zelllinien detektierbar, namentlich in H6c7, AsPC1, BxPC-3, COLO 357, PaTu 8902 und PANC-1. Um eine mögliche Verbindung zwischen dem Phänotyp und der Expression der analysierten Proteine zu untersuchen wurden die Ergebnisse der Analysen verglichen. Dieser Vergleich zeigt eine positive Beziehung zwischen dem epithelialen Phänotyp und einer hohen Expression von E-Cadherin bzw. geringen Vimentin-Expression z. B. in HTB-55 und COLO 357 Zellen. Der mesenchymale Phänotyp tritt gleichzeitig mit einem hohen Vimentin-Gehalt z. B. in COLO-699 und MIA PaCa-2 Zellen auf. PANC-1 Zellen zeigen eine hohe Expression von Vimentin und einen epithelialen Phänotyp. Das Protein Girdin wurde in einigen Lungenkarzinomzelllinien nachgewiesen, welche eine hohe Vimentin- und niedrige E-Cadherin-Expression aufweisen.

4.4 Charakterisierung der Akt-abhängigen Signaltransduktion

Um die molekularen Mechanismen, insbesondere in der Signaltransduktion der K-Ras-/Akt-regulierten Motilität, zu charakterisieren, wurden Zelllinien mit *KRAS*-Mutation (PANC-1, COLO 357, MIA PaCa-2, HCC-44, H23) und mit wildtypischen *KRAS* (COLO-699) zur weiteren Analyse ausgewählt.

4.4.1 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Phosphorylierung der Akt-Kinasen und des ribosomalen Proteins S6

Um die Aktivität und Induzierbarkeit der Akt-Kinasen zu untersuchen, wurde zunächst die Akt-Phosphorylierung an Stelle S473 nach Behandlung der Zellen mit etablierten Wachstumsfaktoren analysiert. Dazu wurden die Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1 und MIA PaCa-2 sowie die Lungenkarzinomzelllinien H23 und COLO-699 über Nacht in DMEM ohne Zusätze kultiviert und anschließend mit EGF, IGF-1, FGF-2, HGF oder PDGF-AA behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Akt-Phosphorylierung an S473 wurde im

4. Ergebnisse

Immunblotverfahren mit einem phospho-spezifischen Antikörper detektiert. Da der MEK-ERK-Signalweg ebenso durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden kann [15], wurde die ERK1/2-Phosphorylierung an T202/Y204 (im Folgenden als ERK1/2-Phosphorylierung bezeichnet) im gleichen Verfahren detektiert.

Der Immunblot in Abb. 4-8 (links) zeigt, dass in PANC-1 Zellen nach EGF- und IGF-1-Behandlung eine deutlich erhöhte Menge an phosphoryliertem Akt (obere Bande) im Vergleich zur Kontrolle vorhanden ist. Ebenso liegt der phospho-Akt-Gehalt nach FGF-2-Behandlung leicht erhöht vor. HGF und PDGF-AA beeinflussen die Akt-Phosphorylierung an S473 nicht. Die ERK1/2-Phosphorylierung wird im Vergleich zur Kontrolle allein durch EGF und FGF-2 deutlich induziert. In COLO-699 Zellen (siehe Abb. 4-8 rechts) ist nach IGF-1-, EGF- und FGF-2-Behandlung eine deutlich erhöhte Menge an phosphoryliertem Akt detektierbar. Ausschließlich die FGF-2-Behandlung resultiert in COLO-699 in einer erhöhten Menge an phosphoryliertem ERK1/2.

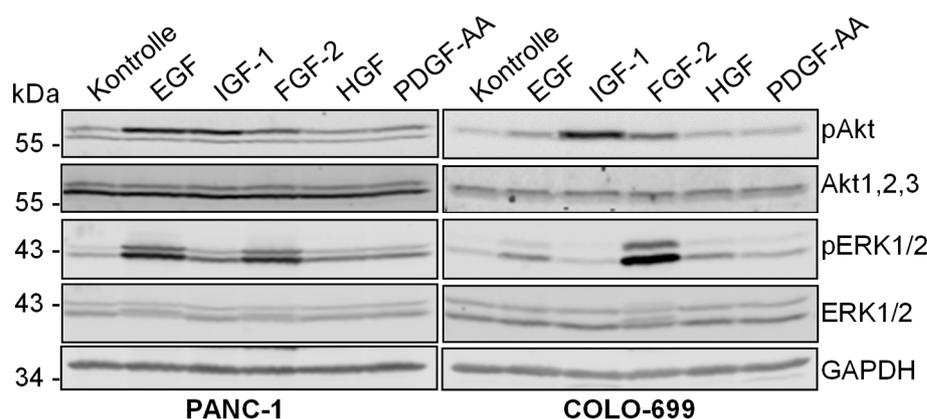


Abb. 4-8: Analyse der Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren. (A, B) Immunblot-Analysen der Akt- und ERK1/2-Phosphorylierung in 50 μ g RIPA-Zelllysate von subkonfluent gewachsenen PANC-1 und COLO-699 Zellen, welche über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert wurden und anschließend mit EGF, IGF-1, FGF-2, HGF, PDGF-AA (je 10 ng/ml) für 12 min behandelt wurden. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Der phospho-Akt(S473)-Nachweis erfolgte mit zwei verschiedenen Antikörpern (#9271, Cell Signaling für PANC-1; #4060, Cell Signaling für COLO-699) und Fluoreszenz-Detektion. Zum Nachweis des gesamten Akt-Gehaltes, sowie der ERK1/2-Phosphorylierung und ERK1/2 wurden spezifische Antikörper reaktiv gegen Akt1,2,3, phospho-ERK1/2 (T202/Y204) und ERK1/2 sowie Fluoreszenz-Detektion eingesetzt. Der Nachweis von GAPDH erfolgte mit einem spezifischen GAPDH-Antikörper und Fluoreszenz-Detektion als Beladungskontrolle (n = 2).

In einem Versuch mit MIA PaCa-2 Zellen ist nach IGF-1- und EGF-Behandlung eine erhöhte Menge an phosphoryliertem Akt detektierbar. Die ERK1/2-Phosphorylierung ist in MIA PaCa-2 deutlich durch EGF induziert (n = 1; nicht gezeigt). In H23 Zellen ist nach EGF- als auch nach IGF-1-Behandlung eine deutlich erhöhte Menge an phosphoryliertem Akt messbar. Weiterhin wird in H23 Zellen, unabhängig von der Behandlung mit den Wachstumsfaktoren, eine hohe

4. Ergebnisse

Menge an phosphoryliertem ERK1/2 detektiert ($n = 1$; nicht gezeigt). Somit wird in den analysierten Zelllinien durch EGF- und IGF-1-Behandlung ein erhöhter Gehalt an phosphoryliertem Akt induziert.

Um zu überprüfen, ob eine Signalweiterleitung durch die phosphorylierten Akt-Kinasen erfolgt, wurde die Phosphorylierung des etablierten Akt-Effektors S6 an Stelle S235/236 in weiteren Experimenten, durchgeführt wie im Abschnitt zuvor beschrieben, überprüft. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 4-9 mit exemplarischen Immunblots der Zelllinien dargestellt.

In PANC-1 Zellen ist ein deutlich erhöhter Gehalt der S6-Phosphorylierung nach EGF-, jedoch nicht nach IGF-1-Behandlung detektierbar. In MIA PaCa-2 Zellen ist S6 nach IGF-1-Behandlung in zwei von drei Versuchen gegenüber der Kontrolle leicht stärker phosphoryliert. In COLO-699 Zellen ist die S6-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle nach EGF- und IGF-1-Behandlung in etwa gleichem Maß induziert. Die Analyse von H23 Zellen zeigt einen hohen Gehalt an phosphoryliertem S6 in der unbehandelten Kontrolle, welcher durch eine EGF-Behandlung nicht beeinflusst wird. Der jeweilige Phospho-Akt-Nachweis (Immunblots unten Abb. 4-9) bestätigt eine EGF- oder IGF-1-induzierte Akt-Phosphorylierung und somit die im Abschnitt zuvor dargelegten Daten.

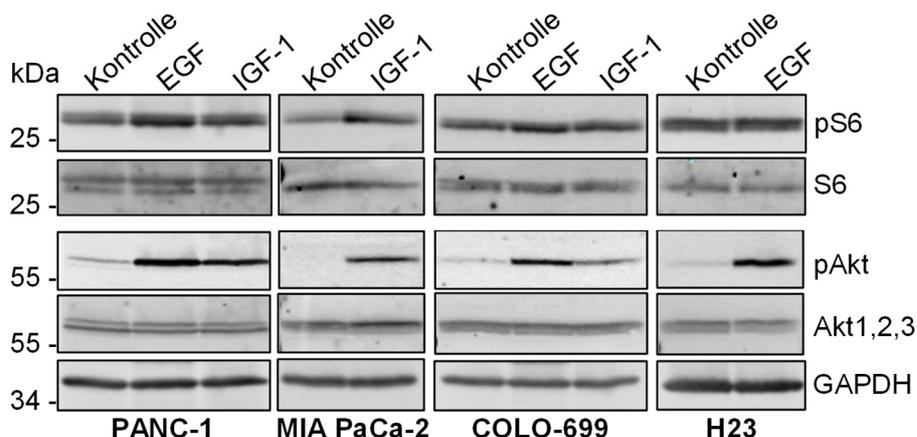


Abb. 4-9: Einfluss von EGF und IGF-1 auf die S6- und Akt-Phosphorylierung. Dargestellt sind Immunblot-Analysen der S6- und Akt-Phosphorylierung in PANC-1, MIA PaCa-2, COLO-699 und H23 Zellen nach Behandlung mit EGF und/oder IGF-1. Subkonfluent gewachsene Zellen wurden dazu über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend mit EGF (30 ng/ml) und/oder IGF-1 (10 ng/ml) für 5 min behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. 50 µg NP-40-Zelllysate wurden im Immunblot-verfahren analysiert. Die Proteinnachweise erfolgten durch Verwendung spezifischer Antikörper reaktiv gegen phospho-Akt(S473) (#9271, Cell Signaling für PANC-1; #4060, Cell Signaling für alle anderen Zelllinien), Akt1,2,3, phospho-S6 (S235/236), S6, GAPDH und Fluoreszenz-Detektion (Immunblots PANC-1, COLO-699). Die Nachweise von phospho-S6/S6 und pAkt/Akt1,2,3 der Proben von MIA PaCa-2 und H23 erfolgten auf unterschiedlichen Membranen. Zum Nachweis der gleichen Beladung wurde jeweils GAPDH nachgewiesen. Der abgebildete GAPDH-Nachweis erfolgte zusammen mit dem pAkt/Akt1,2,3-Nachweis und ist repräsentativ als Beladungskontrolle gezeigt ($n = 3$).

4.4.2 Charakterisierung der Effekte des Akt-Aktivators SC-79

Um eine spezifische Akt-Aktivierung zu erzielen und so Akt-abhängige Signalwege zu charakterisieren, wurden die Zellen mit der pharmakologische Substanz SC-79 („Akt-Aktivator“) behandelt. Diese Substanz ist ein PIP-3-Mimetikum und induziert durch die direkte Bindung an die Akt-PH-Domäne eine Konformationsänderung, welche eine zytosolische Akt-Phosphorylierung ermöglicht [100].

4.4.2.1 Bestimmung der Bedingungen für eine SC-79-Behandlung

Zur Ermittlung der einzusetzenden SC-79-Konzentration und des Behandlungszeitraums für eine ausreichend nachweisbare Akt-Phosphorylierung wurden PANC-1, COLO 357, COLO-699, HCC-44 und H23 in DMEM ohne Zusätze kultiviert und die Zellen in Konzentrationsreihen als auch in Zeitreihen mit SC-79 behandelt. Die Phosphorylierung von Akt und – zur Analyse der Effekte auf den MEK-ERK-Signalweg – von ERK1/2 wurden, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, ermittelt. Ein Teil der Versuche wurde von Jens Bier, AG Prof. Dr. Giehl durchgeführt.

In Abb. 4-10 sind in repräsentativen Immunblots die Ergebnisse der Analysen von PANC-1, COLO-699 und H23 abgebildet. Die SC-79-Konzentrationsreihe mit PANC-1 Zellen zeigt einen deutlich erhöhten phospho-Akt-Gehalt nach Behandlung mit 5 μM , 10 μM oder 20 μM SC-79. Die ERK1/2-Phosphorylierung ist in PANC-1 nach Behandlung mit 10 μM oder 20 μM SC-79 im Vergleich zur Kontrolle positiv beeinflusst (siehe Abb. 4-10). Die Analysen von H23 Zellen zeigen, dass der Gehalt an phosphoryliertem Akt mit 10 μM und 100 μM SC-79 im Vergleich zur Kontrolle deutlich ansteigt (siehe Abb. 4-10A Mitte). Der Gehalt an phosphoryliertem ERK1/2 ist in H23 Zellen nach Behandlung mit 100 μM SC-79 deutlich geringer als in unbehandelten Zellen. Die Analysen von COLO-699 weisen einen erhöhten phospho-Akt-Gehalt ab einer Behandlung mit 1 μM SC-79 nach. Die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 ist in COLO-699 nach Behandlung mit 100 μM SC-79 im Vergleich zur Kontrolle deutlich vermindert. Eine weitere Analyse mit COLO 357 Zellen (Daten nicht abgebildet) zeigt eine deutliche Induktion der Akt-Phosphorylierung unter Verwendung von 10 μM und 100 μM SC-79. Insgesamt zeigen die Versuche somit, dass eine Behandlung mit 10 μM SC-79 in diesen Zelllinien ausreichend für einen deutlich erhöhten Gehalt an phosphoryliertem Akt ist. Diese Konzentration wurde in den folgenden Versuchen zur Bestimmung der benötigten Behandlungszeit eingesetzt.

4. Ergebnisse

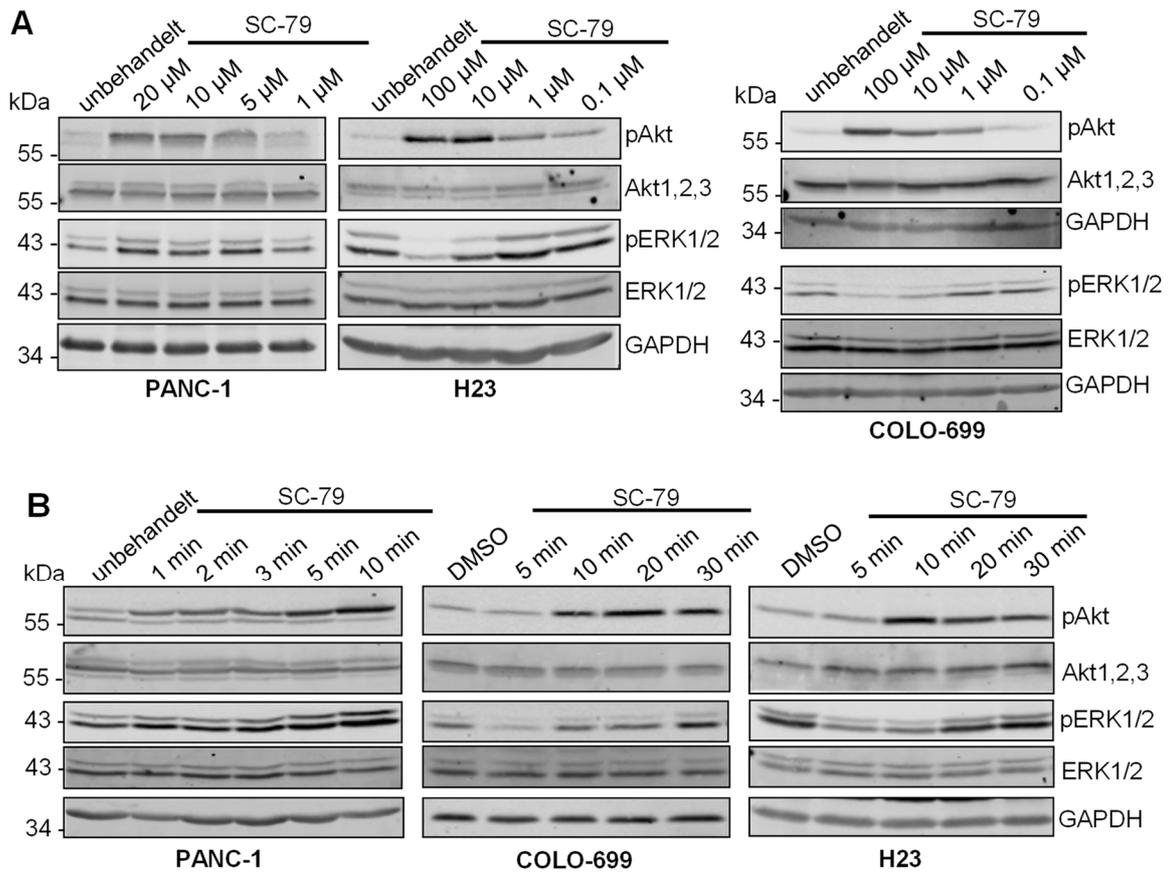


Abb. 4-10. Charakterisierung der Akt- und ERK1/2-Phosphorylierung in Konzentrations- und Zeitreihen mit SC-79. (A) Konzentrationsreihen. Immunblot-Analysen mit 50 μg RIPA-Zellysate von PANC-1, COLO-699 und H23 Zellen. Die Zellen wurden für 10 min mit SC-79 in der angegebenen Konzentration oder als Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. (B) Zeitreihen. Im Immunblotverfahren wurden 50 μg RIPA-Zellysate von PANC-1, COLO-699 und H23 Zellen, die für die angegebene Zeit mit SC-79 (10 μM) oder als Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt wurden, analysiert. (A, B) Zum Nachweis der Akt-Phosphorylierung an S473, des gesamten Akt-Gehaltes sowie der ERK1/2-Phosphorylierung und ERK1/2 wurden spezifische Antikörper, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, eingesetzt. Der Nachweis von GAPDH diente als Beladungskontrolle. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentative Resultate aus zwei (Zeitreihe PANC-1) oder drei unabhängigen Experimenten.

Anhand der Zeitreihe mit PANC-1 Zellen (siehe Abb. 4-10B links) ist zu erkennen, dass innerhalb von 1 - 5 min nach SC-79-Behandlung ein leicht erhöhter Gehalt an phosphoryliertem Akt im Vergleich zur Kontrolle vorliegt, welcher nach 10 min Behandlung ein Maximum erreicht. Die phospho-ERK1/2-Menge ist durch die SC-79-Behandlung positiv beeinflusst. Die Zeitreihe mit COLO-699 Zellen (siehe Abb. 4-10B Mitte) weist nach, dass 10 - 30 min nach der SC-79-Behandlung eine deutlich erhöhte Menge an phosphoryliertem Akt vorhanden ist. Weiterhin sinkt der Gehalt an phosphoryliertem ERK1/2 innerhalb von 5 - 20 min nach der SC-79-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle deutlich ab; liegt nach 30 min dann allerdings deutlich erhöht vor.

4. Ergebnisse

In Analysen mit H23 Zellen (siehe Abb. 4-10B rechts) steigt der phospho-Akt-Gehalt innerhalb von 10 - 30 min nach SC-79-Behandlung deutlich an. Die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 ist im Zeitraum von 5 - 20 min im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert. Weitere Versuche mit HCC-44 Zellen zeigen innerhalb von 10 - 30 min nach SC-79-Behandlung eine erhöhte Menge an phosphoryliertem Akt und phosphoryliertem ERK1/2 (n = 2; nicht abgebildet). Somit induziert SC-79 innerhalb von 10 - 30 min eine deutlich erhöhte Menge an phosphoryliertem Akt. In H23, COLO-699 und HCC-44 Zellen ist die ERK1/2-Phosphorylierung zeitabhängig durch SC-79 beeinflusst. In weiteren Versuchen wurde deshalb der Zeitraum von 30 min zur Behandlung der Zellen gewählt. Die SC-79-induzierten Effekte auf ERK1/2 werden in Kapitel 4.4.2.4 detailliert analysiert.

4.4.2.2 Charakterisierung von SC-79-induzierten Akt-Effektoren

Zur Charakterisierung von putativen Akt-Effektoren wurde die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 an Stelle S235/236 und MDM2 an Stelle S166 nach Behandlung der Zellen (PANC-1, COLO 357, COLO-699 und H23) mit SC-79 – wie im Kapitel zuvor beschrieben – analysiert. Zusätzlich wurde die p38 α -Phosphorylierung an Stelle T180/Y182 analysiert.

Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 4-11 in repräsentativen Immunblots von PANC-1 und COLO-699 Zellen dargestellt. Eine Kontrolle der gleichmäßigen Gel-Beladung erfolgte auf allen Immunblots mittels GAPDH- oder β -Aktin-Nachweis (nicht abgebildet).

In Abb. 4-10B ist die Quantifizierung der Signale entsprechender Immunblots von mindestens drei unabhängigen Versuchen mit COLO 357, PANC-1 und COLO-699 Zellen in einem Balkendiagramm als Mittelwert der relativen Signalintensität \pm SD dargestellt. Die ermittelten Werte sind im Bezug zur Kontrolle (=100 %) abgebildet. Anhand der Quantifizierung und der repräsentativen Immunblots ist im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) die deutlich höhere Menge an phosphoryliertem Akt nach SC-79-Behandlung in PANC-1 COLO-699 und COLO 357 erkennbar. Der Gehalt an phosphoryliertem S6 ist nach SC-79-Behandlung in PANC-1 (210.3 ± 80.7 %, SD; n = 5), COLO-699 (777.2 ± 84.8 %, SD; n = 3) und COLO 357 (405.7 ± 62.2 %, SD; n = 5) im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht. Die Auswertungen der phospho-MDM2-Nachweise zeigen in PANC-1 Zellen mit 346 ± 99.4 % (SD; n = 3) und COLO-699 Zellen mit 530.4 ± 25.0 % (SD; n = 3) einen deutlich höheren Gehalt als in der Kontrolle. In COLO 357 Zellen konnte MDM2 nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Analyse der p38-Phosphorylierung konnte ausschließlich in PANC-1 Zellen erfolgen, da die Färbungen bei COLO-699 und COLO 357 Zellen zu schwach für eine adäquate Auswertung ausfielen. In PANC-1 Zellen wurde in zwei Versuchen ein deutlich höherer Gehalt an phosphoryliertem p38 in SC-79-behandelten Zellen vergleichend zu DMSO-behandelten Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 4-11A).

4. Ergebnisse

In weiteren Versuchen mit der Zelllinie H23 liegt der phospho-Akt-Gehalt nach SC-79-Behandlung schwach erhöht vor (nicht abgebildet; siehe dazu auch Kapitel 4-11). Die Analysen zeigen keine maßgeblich veränderte Menge an phosphoryliertem S6 durch die SC-79-Behandlung. Die MDM2-Phosphorylierung ist in diesen Analysen nicht eindeutig detektierbar.

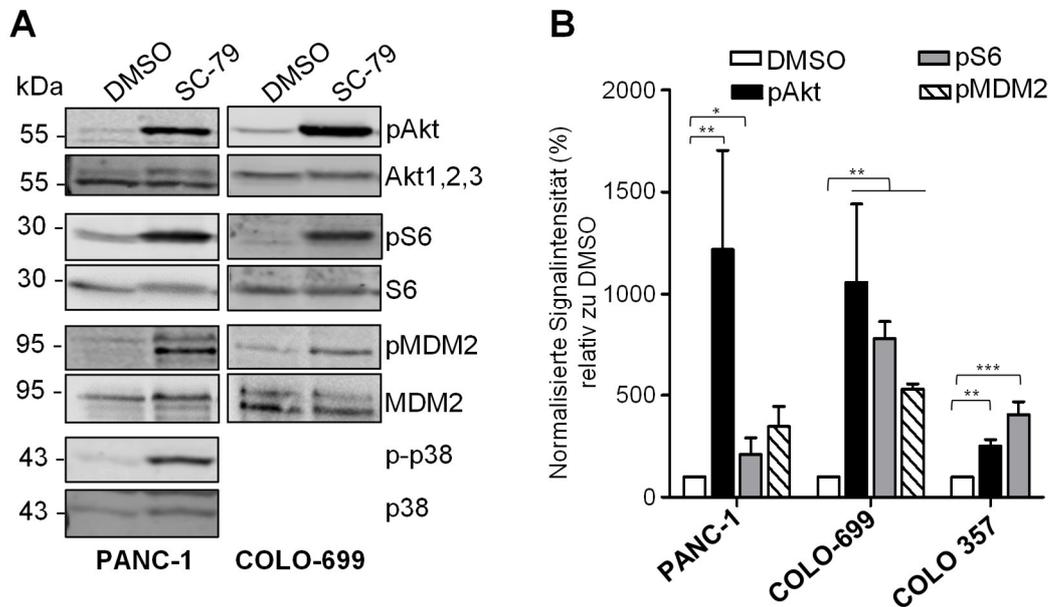


Abb. 4-11. Einfluss von SC-79 auf die Phosphorylierung von Akt und Akt-Effektoren. (A) Immunblot-Analysen von PANC-1- und COLO-699-Zelllysaten nach Behandlung der Zellen mit SC-79. Subkonfluente Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend mit SC-79 (10 μ M) für 30 min behandelt. Die Behandlung mit DMSO (0.1 %) diente als Kontrolle. 50 μ g RIPA-Zelllysate wurden im Immunblotverfahren analysiert. Der Proteinnachweis erfolgte durch Verwendung spezifischer Antikörper gegen phospho-Akt(S473;#9271, Cell Signaling für PANC-1, #4060, Cell Signaling für COLO-699), Akt1,2,3, phospho-S6(S235/236), S6, phospho-MDM2(S166), MDM2, phospho-p38(T180/Y182) und p38 α . Die Proteindetektion erfolgte mit Fluoreszenz-gekoppelten- oder HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (nur MDM2-, S6-Nachweis). (B) Quantifizierung der relativen Signalintensität. Es wurden die Banden von Immunblots mit PANC-1-, COLO-699- und COLO 357-Zelllysaten – die zuvor wie in (A) beschrieben, behandelt und analysiert wurden – densitometrisch vermessen. Die relative Phosphorylierung wurde bezogen auf die Gesamtexpression des jeweiligen Proteins berechnet. Dieser Wert wurde in Relation zum Wert der DMSO-behandelten Kontrolle (= 100 %) gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwerte der relativen Signalintensität \pm SD ($n \geq 3$; T-Test im Vergleich zur DMSO-Behandlung: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

4.4.2.3 Identifizierung von putativen Akt-Effektoren in H23 Zellen

In H23 Zellen wurde ein hoher Gehalt an phosphorylierten Proteinen, wie ERK1/2 und S6 detektiert, welche nicht durch die Behandlung mit EGF oder SC-79 induziert werden konnten. Um putativ Akt-induzierte Effektoren in H23 Zellen zu identifizieren, wurden die Mengen an phosphorylierter GSK3 α , GSK3 β , FoxO3a und der p70S6K in SC-79-behandelten Lysaten von H23 Zellen im Immunblotverfahren, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, untersucht. Zum Vergleich erfolgte die Analyse ebenso mit COLO-699-Zelllysaten.

4. Ergebnisse

Die Analysen von H23 Zellen (Abb. 4-12 links) zeigen, dass der Gehalt der p70S6K-Phosphorylierung nach 5 min SC-79-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Behandlung leicht ansteigt und den höchsten Gehalt nach 30 min Behandlung erreicht. Der Gehalt an phosphorylierter GSK3 α und GSK3 β ist 10 min nach SC-79-Behandlung leicht erhöht und steigt im zeitlichen Verlauf der Behandlung weiter an. Die Menge an phosphoryliertem FoxO3a ist nach 30 min SC-79-Behandlung leicht erhöht. In COLO-699 Zellen (siehe Abb.4-12 rechts) zeigt sich eine leicht erhöhte Menge an phosphorylierter p70S6K 20 min nach SC-79-Behandlung. Die Mengen der phosphorylierter GSK3 α und GSK3 β steigen nach der SC-79-Behandlung leicht an und erreichen nach 30 min SC-79-Behandlung den höchsten Wert. Der Gehalt an phosphoryliertem FoxO3a wird durch die SC-79-Behandlung nicht beeinflusst. Somit werden die GSK3 α , GSK3 β und die p70S6K in H23 und COLO-699 Zellen zeitabhängig nach SC-79-Behandlung phosphoryliert. Die FoxO3a-Phosphorylierung wird einzig in H23 Zellen SC-79-vermittelt induziert.

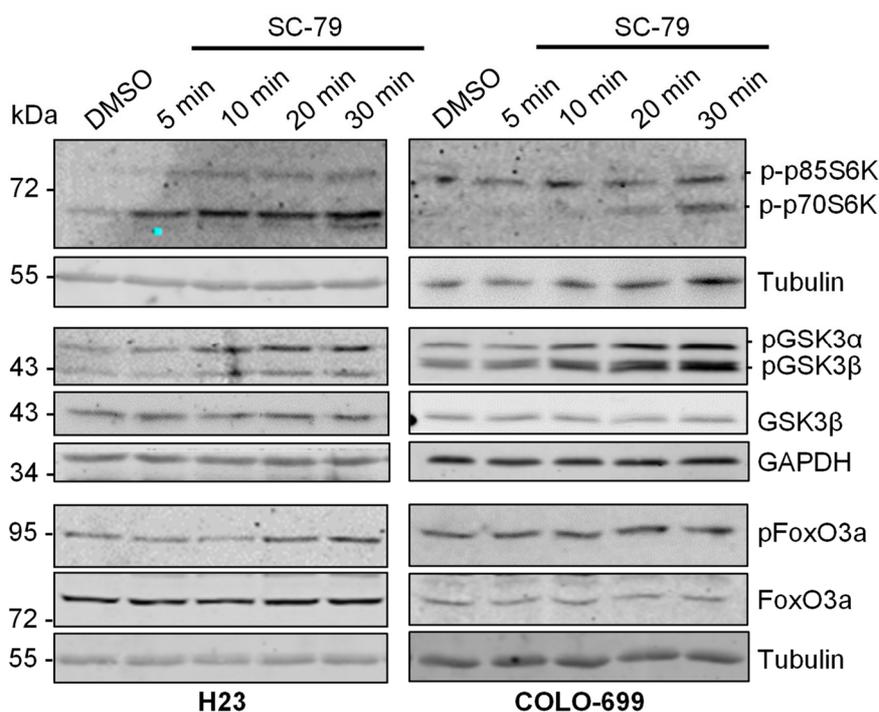


Abb. 4-12. Effekt von SC-79 auf die Phosphorylierung der p70S6K, GSK3 α / β und FoxO3a in H23 und COLO-699 Zellen. Immunblot-Analysen der p70S6K-, GSK3 α / β - und FoxO3a-Phosphorylierung in 50 μ g RIPA-Zellysaten von H23 und COLO-699 Zellen nach Behandlung mit SC-79. Subkonfluente Zellen wurden für 15 h in DMEM ohne Zusätze kultiviert und anschließend wie angegeben mit SC-79 (10 μ M) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %; 30 min) behandelt. Die Detektion der Proteine erfolgte im Immunblotverfahren mit spezifischen Antikörpern gegen phospho-GSK3 α / β (S21/9, #9331, Cell Signaling), GSK3 β , phospho-p70S6-Kinase-1(T389), phospho-FoxO1a(T24)/FoxO3a(T32), FoxO3a, α -Tubulin und GAPDH sowie Fluoreszenz- oder ECL-Detektoren (p-p70S6K-Nachweis, α -Tubulin-Nachweis). Die Tubulin- und GAPDH-Nachweise dienten als Beladungskontrollen (n = 3).

4.4.2.4 Auswirkungen einer MEK1/2-Inhibition auf SC-79-induzierte Protein-phosphorylierungen

In COLO 357, PANC-1 und COLO-699 Zellen konnte nach Behandlung mit SC-79 ein deutlich erhöhter Gehalt der ERK1/2- und S6-Phosphorylierung, sowie in PANC-1 Zellen eine deutliche Induktion der p38-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Zur Prüfung, ob MEK1/2 die SC-79-induzierte Phosphorylierung dieser Proteine vermittelt, wurden die Zellen, wie in Kapitel 4.4.2.2. beschrieben, mit SC-79 allein und in Kombination mit dem MEK1/2 Inhibitor UO-126 behandelt. Zur Analyse der Effekte einer Akt-Inhibition auf die Phosphorylierung dieser Proteine wurden Zellen mit dem Akt-Inhibitor AktVIII behandelt. Anschließend wurden die Lysate, wie in Kapitel 4.4.2.2 beschrieben, im Immunblotverfahren analysiert. Die Analysen von COLO 357 (nicht abgebildet; n = 3), PANC-1 und COLO-699 Zellen (Abb. 4-13) zeigen, dass die Behandlung mit SC-79+UO-126 im Vergleich zur SC-79-Behandlung in einer geringen Menge an phosphoryliertem ERK1/2 resultiert. Der Gehalt an phosphoryliertem Akt ist in diesen beiden Proben im Vergleich zur Kontrolle gleich stark erhöht.

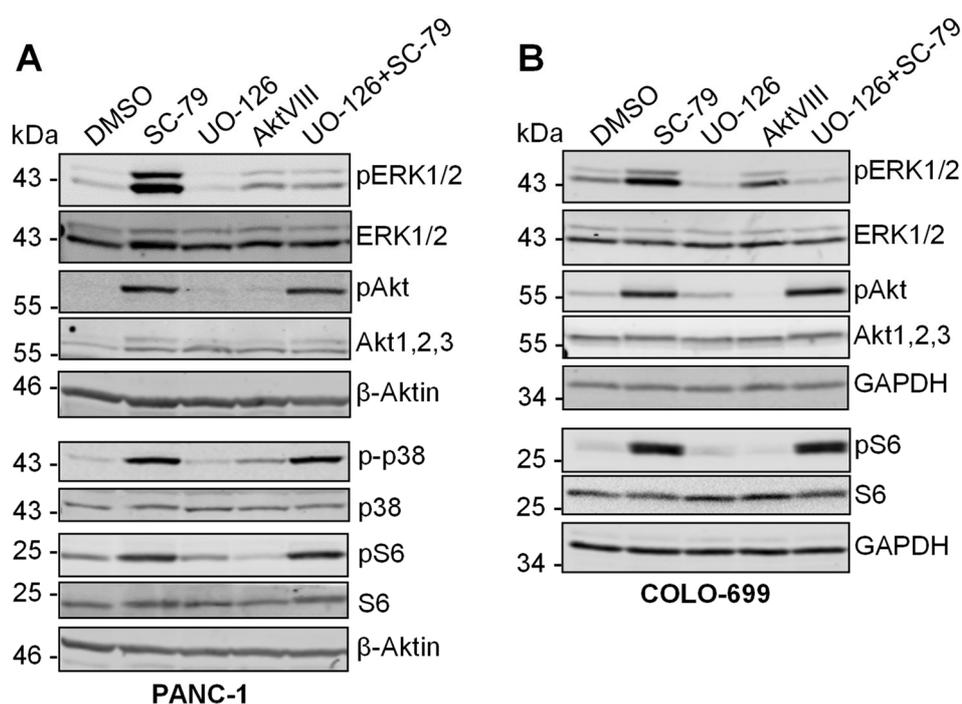


Abb. 4-13. Einfluss einer MEK1/2-Inhibition auf die SC-79-induzierte ERK1/2-, S6 und p38-Phosphorylierung. (A,B) Immunblot-Analysen der ERK1/2-, Akt-, p38- und S6-Phosphorylierung in PANC-1 und COLO-699 Zellen nach Behandlung mit SC-79 und/oder dem MEK1/2 Inhibitor UO-126 sowie dem Akt-Inhibitor AktVIII. Subkonfluent gewachsene Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend 30 min mit SC-79, UO-126, SC-79 + UO-126, AktVIII (alle je 10 μ M) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. 50 μ g RIPA-Zelllysate wurden im Immunblotverfahren und mit spezifischen Antikörpern, wie in Kapitel 4.4.2.2 beschrieben, analysiert. Die Detektion erfolgte mit Fluoreszenz- oder HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (n = 3). Als Ladekontrolle wurde β -Aktin oder GAPDH nachgewiesen.

4. Ergebnisse

Die Behandlung der Zellen mit UO-126 führt im Vergleich zur Kontrolle zu einem geringen Gehalt an phosphoryliertem ERK1/2. Dies bestätigt die Inhibition von MEK1/2 durch UO-126. Somit ist die SC-79-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung MEK1/2-abhängig. Die Behandlung mit AktVIII führt in den Zelllinien zu einer geringen Menge an phosphoryliertem Akt und in COLO 357 und COLO-699 Zellen zu einer tendenziell erhöhten Menge an phosphoryliertem ERK1/2. Die Analysen der S6-Phosphorylierung in PANC-1, COLO 357 und COLO-699 Zellen zeigen, dass die Behandlung mit SC-79+UO-126 oder SC-79 zu einer gleich stark erhöhten Menge an phosphoryliertem S6 führen. Nach alleiniger UO-126-Behandlung ist der Gehalt der S6-Phosphorylierung unverändert. Dies gilt in PANC-1 Zellen auch für die p38-Phosphorylierung. Somit sind die SC-79-induzierten Effekte auf p38 und S6 im analysierten Zeitraum nicht MEK1/2-vermittelt. Die Behandlung mit AktVIII resultiert vergleichend zur Kontrolle jeweils in einem vermindertem phospho-S6-Gehalt und zeigt folglich die Akt-abhängige S6-Phosphorylierung.

4.5 Charakterisierung der Kinase-Aktivität der drei Akt-Isoformen

Die phosphorylierten Formen von Akt1, Akt2 und Akt3 werden aufgrund ihres fast identischen Molekulargewichtes im Immunblotverfahren nicht ausreichend aufgetrennt, um einen spezifischen Nachweis mit einem phospho-spezifischen Akt-Antikörper zu erhalten. Um die spezifische Aktivität von Akt1, Akt2 und Akt3 zu ermitteln, wurden isoformspezifische Akt-Kinase-Assays durchgeführt.

4.5.1 Aktivität von Akt1, Akt2 und Akt3 in H1299 Zellen

Für die Lungenkarzinomzelllinie H1299 konnte Grabinski *et al.* mittels isoformspezifischer Akt-Kinase-Assays nachweisen, dass eine prominente Akt3-Aktivität sowie eine leicht erhöhte Akt1- und Akt2-Aktivität nach EGF-Behandlung vorliegt [101]. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Manfred Jücker (UKE Hamburg) wurde dieser Assay im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst mit H1299 Zellen etabliert. Hierzu wurden die Akt-Isoformen mit isoform-spezifischen Akt-Antikörpern aus NP-40-Lysaten präzipitiert und anschließend mit dem GSK3 α / β -GST-Fusionsprotein (GSK3 α / β -GST) als Akt-Substrat und ATP inkubiert. Als Negativkontrolle wurde mit einem Maus-IgG2a-Antikörper präzipitiert. Die Phosphorylierung des GSK3 α / β -GST wurde im Immunblotverfahren bestimmt und diente als Maß für die Aktivität. Das Ergebnis eines Experiments nach EGF- und SC-79-Behandlung ist in Abb. 4-14A gezeigt. Der Akt1,2,3-Nachweis im unteren Teil des Immunblots (obere Bande) zeigt eine vergleichbare Präzipitation der Akt-Isoformen aus H1299-Zelllysaten nach Anpassung der Lysatmengen auf die jeweilige Expression. Der Nachweis der schweren Antikörper-Kette (IgG-Nachweis, untere Bande) zeigt den vergleichbaren Einsatz der IP-Antikörper in den Ansätzen.

4. Ergebnisse

Der obere Teil des Immunblots dokumentiert anhand der GSK3 α / β -GST-Phosphorylierung, dass die Akt1-Aktivität nach EGF-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Behandlung deutlich erhöht vorliegt. Die SC-79-Behandlung induziert die Akt1-Aktivität nicht. Für Akt2 ist in dem abgebildeten Immunblot eine deutliche Aktivität erkennbar. Dies konnte in einem zweiten Versuch nicht bestätigt werden. SC-79 induziert die Akt2-Aktivität in zwei unabhängigen Versuchen nicht. Die Akt3-Aktivität wird durch die EGF-Behandlung sehr deutlich und durch SC-79 schwächer induziert. In der Negativkontrolle (mit IP IgG bezeichnet) ist eine minimale GSK3 α / β -GST-Phosphorylierung nachweisbar, was eine geringfügige, unspezifische Phosphorylierung des GSK3 α / β -GST zeigt. Der Nachweis der Akt-Phosphorylierung in korrespondierenden Gesamtzelllysaten (Abb. 4-14B) weist nach, dass einzig die EGF-Behandlung eine deutlich erhöhte Akt-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle induziert. Insgesamt ist der Assay somit für die Detektion der isoformspezifischen Akt-Aktivität geeignet.

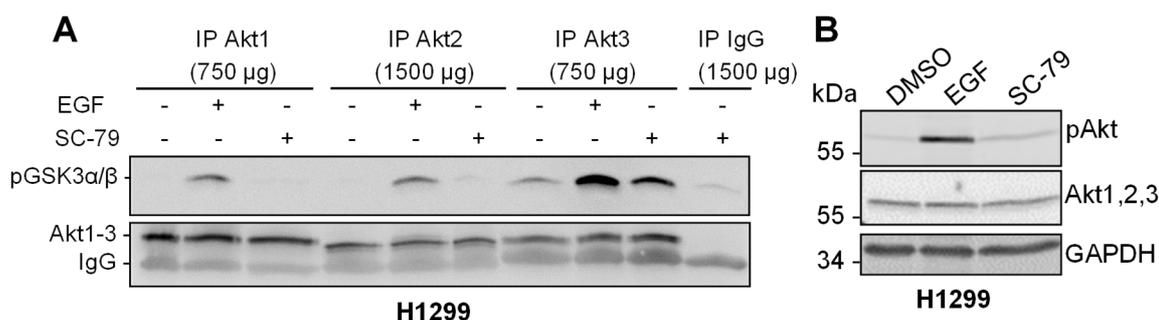


Abb. 4-14. Kinase-Aktivität von Akt1, Akt2 und Akt3 in H1299 Zellen nach Behandlung mit EGF und SC-79. (A) Immunblot-Analyse isoformspezifischer *in vitro* Akt-Kinase-Assays, welche mit Lysaten der Zelllinien H1299 durchgeführt wurden. Subkonfluent gewachsene Zellen wurden über Nacht in DMEM ohne Zusätze kultiviert und anschließend mit EGF (30 ng/ml; 5 min), SC-79 (10 μ M; 30 min) oder als Kontrolle mit DMSO (0.1 %; 30 min) behandelt. Um gleiche Mengen der Akt-Isoformen zu präzipitieren, wurden die in der IP eingesetzten Lysatmengen angeglichen. Zur Kontrolle wurde mit einem Maus-IgG2a-Antikörper (IP IgG) präzipitiert. Die Phosphorylierung der GSK3 α / β -GST und die Menge der präzipitierten Akt-Isoformen wurde im Immunblotverfahren durch Verwendung von Antikörpern gegen pGSK3 α / β (S21/9; #9327, Cell Signaling) und Akt1,2,3 detektiert sowie ECL- oder Fluoreszenz-Detektion. Der Nachweis von IgG diente als Kontrolle des gleichmäßigen IP-Antikörper-Einsatzes. (B) Immunblot-Analyse der Akt-Phosphorylierung in korrespondierenden H1299-Lysaten, die im Kinase-Assay verwendet wurden. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Immunblotverfahren unter Verwendung von 50 μ g Probe und Antikörpern, die spezifisch phospho-Akt(S473; #4060 Cell Signaling), Akt1,2,3, und GAPDH erkennen. Der GAPDH-Nachweis diente als Ladekontrolle. Die Detektion erfolgte mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (n = 2).

4. Ergebnisse

4.5.2 Kinase-Aktivität der drei Akt-Isoformen in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien

Um die Kinase-Aktivität der einzelnen Akt-Isoformen in H23, COLO-699, MIA PaCa-2 und PANC-1 Zellen zu ermitteln, wurden *in vitro* Akt-Kinase-Assays, wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden zur Induktion der Akt-Aktivität mit EGF und/oder IGF-1 als auch mit SC-79 behandelt. Um die relative Akt-Kinase-Aktivität zu ermitteln, wurde die detektierte GSK3 α/β -GST-Phosphorylierung, bezogen auf die präzipitierten Akt-Mengen, durch densitometrische Bestimmung der Signalstärke berechnet.

In Abb. 4-15A ist ein repräsentativer Immunblot für H23 Zellen gezeigt. Der Akt1,2,3-Nachweis zeigt eine vergleichbare Präzipitation der Akt-Isoformen (unterer Immunblot), welche durch Einsatz unterschiedlicher Lysatmengen erreicht wurde (IP Akt1 = 750 μ g; IP Akt2 = 1500 μ g; IP Akt3 = 1000 μ g). Der Nachweis der GSK3 α/β -GST-Phosphorylierung (Immunblot oben) zeigt, dass EGF-behandelte Zellen keine Akt1- oder Akt2-Aktivität aufweisen (n = 2). Zwei weitere Versuche zeigten eine minimale Akt1- und Akt2-Aktivität (nicht dargestellt). In SC-79-behandelten Zellen ist jeweils keine Akt1- oder Akt2-Aktivität nachweisbar. Für Akt3 ist nach EGF-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Aktivität nachweisbar (11 \pm 4.5-fach, SD; n = 3). Auch nach SC-79-Behandlung ist die Akt3-Aktivität (4.5 \pm 2.4-fach, SD; n = 3) deutlich erhöht. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass in H23 Zellen prädominant Akt3 durch EGF oder SC-79 aktiviert wird.

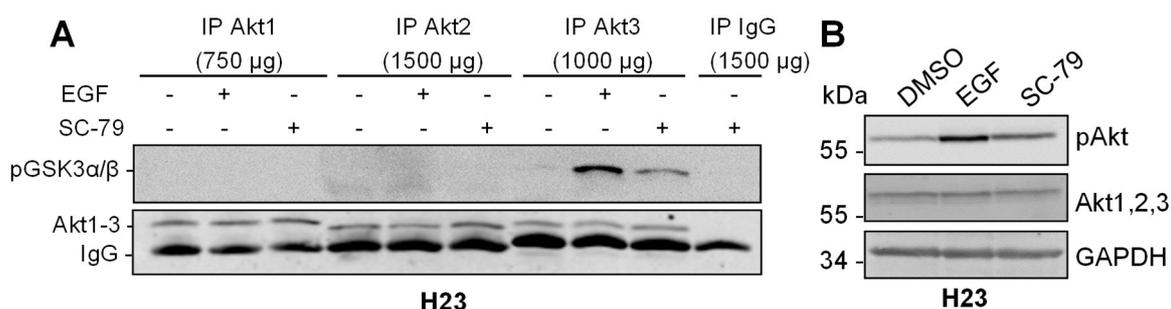


Abb. 4-15. Kinase-Aktivität von Akt1, Akt2 und Akt3 in H23 Zellen nach Behandlung mit EGF und SC-79. (A) Immunblot-Analyse isoformspezifischer *in vitro* Akt-Kinase-Assays, welche mit H23-Zelllysaten durchgeführt wurden. Subkonfluent gewachsene Zellen wurden über Nacht in DMEM ohne Zusätze kultiviert und anschließend mit EGF (30 ng/ml; 5 min), SC-79 (10 μ M; 30 min) oder als Kontrolle mit DMSO (0.1 %; 30 min) behandelt. Die Kinase-Assays wurden, wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, durchgeführt und die Proben im Immunblotverfahren analysiert. (B) Immunblot-Analyse der Akt-Phosphorylierung in korrespondierenden H23-Zelllysaten, die im Kinase-Assay verwendet wurden. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Immunblotverfahren unter Verwendung von 50 μ g Probe und Antikörpern, die spezifisch phospho-Akt(S473; #4060), Akt1,2,3 und GAPDH erkennen. Der GAPDH-Nachweis diente als Ladekontrolle. Die Detektion erfolgte mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (n = 3).

4. Ergebnisse

In COLO-699 Zellen wurde die Aktivität der einzelnen Akt-Isoformen nach EGF-, IGF-1- und SC-79-Behandlung analysiert. Eine vergleichbare Präzipitation der Akt-Isoformen, erkennbar anhand des Akt1,2,3-Nachweises im jeweils oberen Immunblot in Abb. 4-16A-B, wurde durch Einsatz von 750 µg Lysat für die IP von Akt1, 1500 µg Lysat für die Akt2-Präzipitation und 1000 µg Lysat für die Akt3-Präzipitation erreicht. In fünf von sieben Versuchen zeigt sich eine schwache Akt1-Aktivität EGF-behandelter Zellen (siehe Abb. 4-16B). Eine deutliche Akt1-Aktivität ist im Vergleich zur Kontrolle in SC-79-behandelten Zellen nachweisbar (siehe Abb. 4-16A). Die IGF-1-Behandlung induziert hingegen keine Akt1-Aktivität (Abb. 4-16B). Eine Akt2-Aktivität ist in vier von sechs unabhängigen Versuchen in EGF-behandelten Zellen nicht detektierbar (siehe Abb. 4-16A), während zwei Versuche eine minimale Akt2-Aktivität zeigen (nicht dargestellt). In SC-79-behandelten Zellen ist in zwei von vier Versuchen eine geringe Akt2-Aktivität nachweisbar. IGF-1 induziert die Akt2-Aktivität jeweils nicht (Abb. 4-16B). Akt3 wird durch EGF, SC-79 und IGF-1 in unterschiedlichem Ausmaß aktiviert (Abb. 4-16A-B). Die EGF-Behandlung, als auch die SC-79-Behandlung führen im Vergleich zur Kontrollkondition im Mittel zu einer 21.2 ± 16 -fach (SD; n = 5) bzw. 31.3 ± 8.8 -fach (SD; n = 4) induzierten Akt3-Aktivität. In IGF-1-behandelten Zellen ist die Akt3-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle im Mittel um das 5.6 ± 3.6 -fache (SD; n = 3) erhöht. Zusammenfassend wird in COLO-699 Zellen prädominant Akt3 durch die verschiedenen Stimuli aktiviert.

In weiteren *Assays* mit IGF-1- und SC-79-behandelten MIA PaCa-2 Zellen (siehe Abb. 4-16C) ist Akt1 durch keine der Substanzen aktiviert worden. Die Induktion der Akt2-Aktivität konnte nur nach IGF-1-, jedoch nicht nach SC-79-Behandlung in zwei von drei *Assays* nachgewiesen werden. Die Akt3-Aktivität ist deutlich durch IGF-1 (32.8 ± 8 -fach, SD; n = 3) und schwächer durch SC-79 (1.4-fach; n = 2) induziert. Der Nachweis der Akt-Phosphorylierung in korrespondierenden Gesamtlysaten (Abb. 4-16D) zeigt eine erhöhte Akt-Phosphorylierung nach IGF-1- und SC-79-Behandlung. Zusammenfassend werden in MIA PaCa-2 Zellen Akt2 schwach und Akt3 sehr deutlich durch IGF-1 aktiviert. SC-79 induziert im direkten Vergleich zu IGF-1 eine geringere Akt3-Aktivität.

4. Ergebnisse

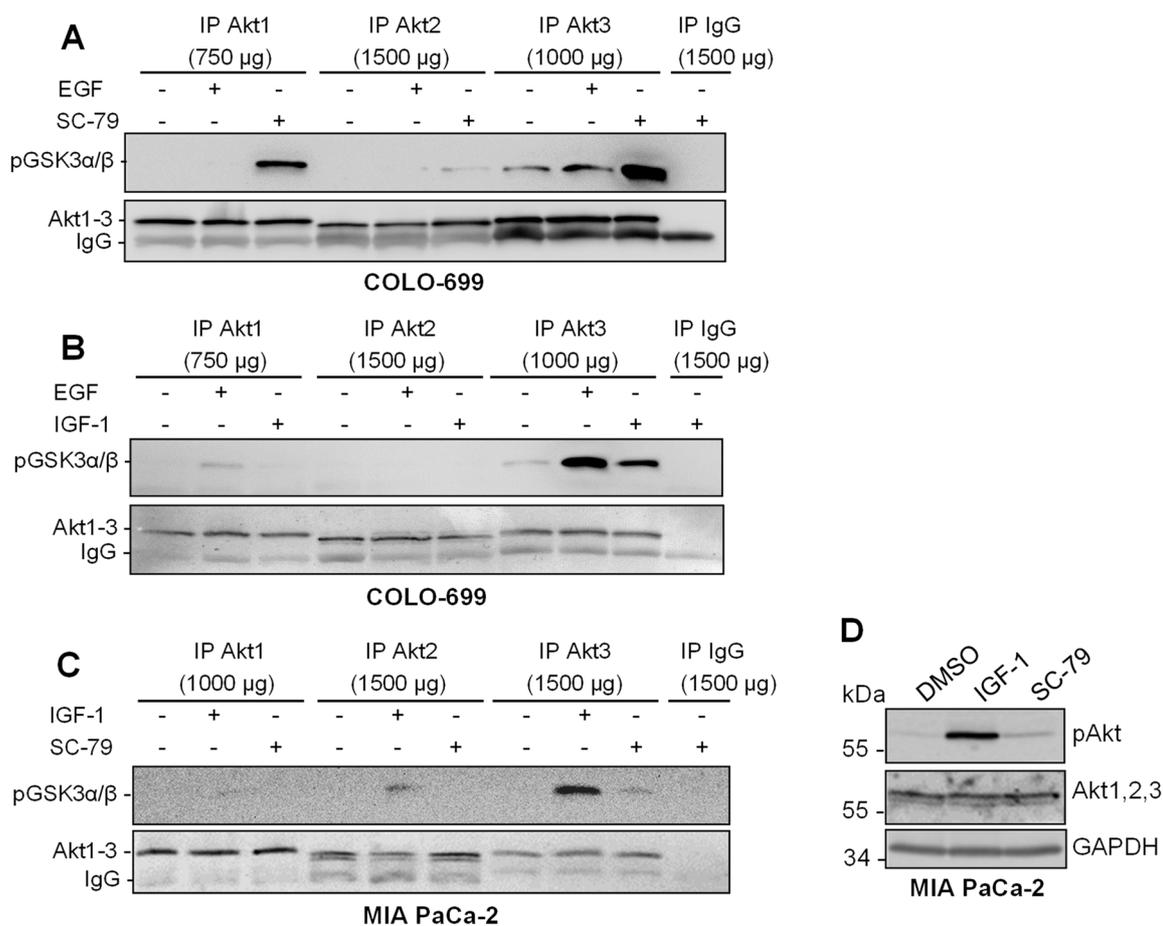


Abb. 4-16. Kinase-Aktivität von Akt1, Akt2 und Akt3 in COLO-699 und MIA PaCa-2 Zellen. (A,C) Immunblot-Analysen von isoformspezifischen *in vitro* Akt-Kinase-Assays, die mit Lysaten der Zelllinien COLO-699 (A,B) oder MIA PaCa-2 (C) durchgeführt wurden. Subkonfluent gewachsene Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend in (A) mit EGF (30 ng/ml; 5 min), (B,C) SC-79 (10 µM; 30 min) oder in (B,C) mit IGF-1 (10 ng/ml; 5 min) sowie in (A-C) zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %; 30 min) behandelt. Die Kinase-Assays wurden, wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, durchgeführt und die Proben im Immunblotverfahren analysiert. Es ist jeweils ein repräsentativer Immunblot dargestellt (COLO-699 n ≥ 3; MIA PaCa-2 n = 2 - 3) (C) Immunblot-Analyse der Akt-Phosphorylierung in korrespondierenden MIA PaCa-2-Lysaten. Der Nachweis erfolgte im Immunblotverfahren mit 50 µg Probe/Spur und Antikörpern, die spezifisch phospho-Akt(S473; #4060 Cell Signaling), Akt1,2,3 und GAPDH erkennen. Der GAPDH-Nachweis diente als Ladekontrolle. Die Detektion erfolgte mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (n = 2).

Um die Kinase-Aktivität von Akt1, Akt2 und Akt3 in PANC-1 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit EGF, SC-79 oder IGF-1 behandelt und im Akt-Kinase-Assay analysiert. Der Nachweis von Akt1,2,3 in Abb. 4-17A-B zeigt die gleichmäßige Präzipitation von Akt1 und Akt2. Für eine gleichmäßige Präzipitation wurde für die Akt1-IP 5-fach mehr Lysat eingesetzt als für die Akt2-IP. Die präzipitierte Akt3-Menge aus 1500 µg Lysat fällt sehr gering aus. Da der Einsatz von 2000 µg Zelllysate in einem weiteren Versuch nicht zu einer erhöhten präzipitierten Akt3-Menge führte, ist die Akt3-Expression in PANC-1 Zellen zu gering für eine vergleichbare Präzipitation aller Akt-Isoformen.

4. Ergebnisse

Im oberen Immunblot in Abb. 4-17A-B ist zu erkennen, dass die Negativkontrolle (IP IgG) eine deutliche GSK3 α/β -GST-Phosphorylierung aufweist. Dieses Signal wird nicht bei Einsatz von 250 μg oder 1250 μg Lysat detektiert (nicht abgebildet) und ist somit auf die hohe eingesetzte Lysatmenge von 1500 μg zurückzuführen. Nach Abzug des Signals der Negativkontrolle ist noch eine deutliche Akt1-Aktivität nach EGF-Behandlung und eine schwache Akt1-Aktivität nach SC-79-Behandlung vorhanden. Da für die Akt2-Präzipitation 250 μg Lysat eingesetzt wurde, ist das Signal der Negativkontrolle nicht abzuziehen. Somit ist die Akt2-Aktivität durch eine EGF-Behandlung induziert. Wird Akt3 aus den Lysaten präzipitiert, so ist nach EGF- und SC-79-Behandlung eine deutlich erhöhte pGSK3 α/β -GST-Menge im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar. Nach Abzug des Signals der Negativkontrolle ergibt sich eine schwache Akt3-Aktivität ausschließlich nach EGF-Behandlung. Die Assays von IGF-1-behandelten Zellen (siehe Abb. 4-17B) zeigen in zwei von drei Versuchen einzig eine deutliche Akt2-Aktivität. Für PANC-1 Zellen konnte somit insgesamt gezeigt werden, dass sowohl Akt1, Akt2 als auch Akt3 durch EGF und ausschließlich Akt2 durch IGF-1 aktiviert werden. SC-79 induziert eindeutig die Akt1-Aktivität.

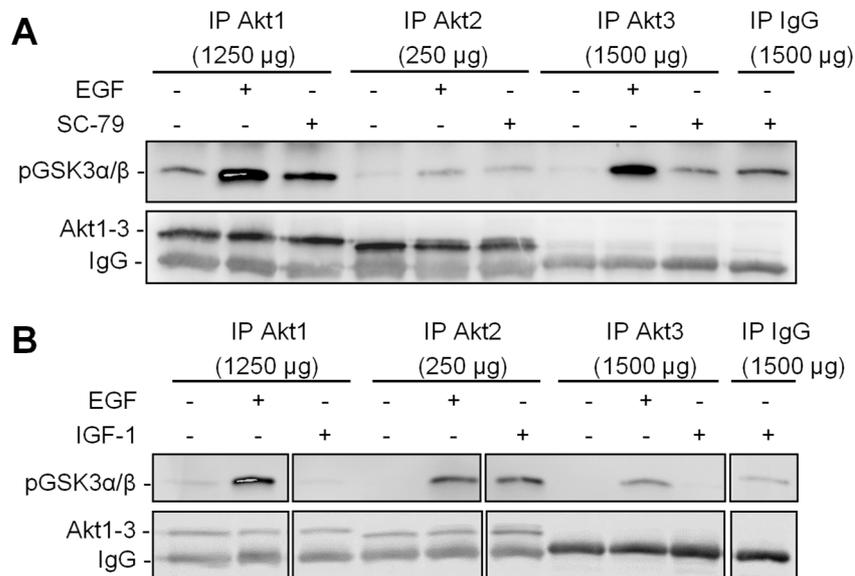


Abb. 4-17. Kinase-Aktivität von Akt1, Akt2 und Akt3 in PANC-1 Zellen. (A, B) Immunblots von isoformspezifischen *in vitro* Akt-Kinase-Assays, die mit Lysaten von PANC-1 Zellen durchgeführt wurden. Subkonfluent gewachsene Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium kultiviert und anschließend in (A) mit EGF (30 ng/ml; 5 min), SC-79 (10 μM ; 30 min) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %; 30 min) behandelt sowie in (B) mit EGF (30 ng/ml; 5 min) oder IGF-1 (10 ng/ml; 5 min) behandelt. Unbehandelte Zellen dienten in (B) als Kontrolle. Die Kinase-Assays wurden, wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, durchgeführt und die Proben im Immunblotverfahren analysiert. Es ist jeweils ein repräsentativer Immunblot dargestellt ($n \geq 3$).

4.6 Charakterisierung der PI3-K/Akt-abhängigen Signaltransduktion

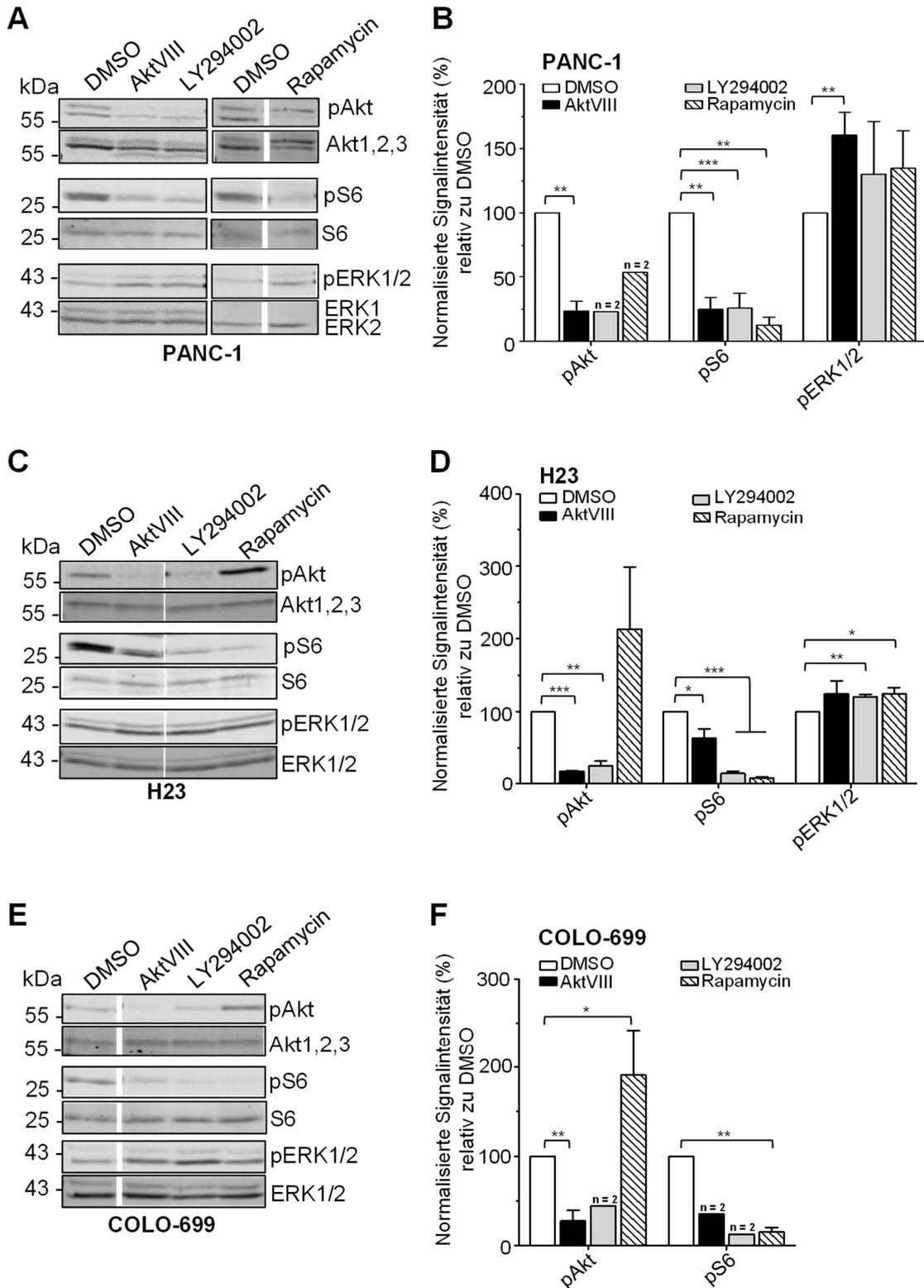
4.6.1. Analyse des PI3-K/Akt-mTOR-S6-Signalweges

Um den PI3-K/Akt-mTOR-S6-Signalweg in PANC-1, COLO 357, COLO-699 und H23 Zellen zu analysieren, wurden die PI3-K, die Akt-Kinasen und mTOR durch spezifische Inhibitoren gehemmt. Dazu wurden die Zellen 15 h mit dem PI3-K-Inhibitor LY294002, dem Akt-Inhibitor AktVIII oder dem mTOR-Inhibitor Rapamycin in DMEM ohne Zusätze behandelt und, wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben, im Immunblotverfahren analysiert und die detektierten Signale densitometrisch quantifiziert. Die Ergebnisse der Analysen von PANC-1, COLO-699 und H23 sind mit repräsentativen Immunblots und im Balkendiagramm mit Darstellung der relativen Signalstärke der Protein-Nachweise als Mittelwert \pm SD in Abb. 4-18 dargestellt. Die Ergebnisse der densitometrischen Analysen sind Tabelle 10-1 im Anhang zu entnehmen.

Die Analysen von PANC-1 Zellen (siehe Abb. 4-18A+B) zeigen, dass die Behandlung mit LY294002 oder AktVIII zu einem deutlich verringerten Gehalt an phosphoryliertem Akt und phosphoryliertem S6 im Vergleich zur DMSO-Behandlung führen. Die Rapamycin-Behandlung beeinflusst die Akt-Phosphorylierung in zwei Versuchen schwach negativ und reduziert die S6-Phosphorylierung deutlich ($n = 3$). Nach Behandlung mit AktVIII, LY294002 oder Rapamycin wird jeweils eine tendenziell erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 detektiert ($n \geq 3$). Die Immunblots und die densitometrischen Auswertungen aus drei Versuchen mit H23 Zellen zeigen (Abb. 4-18C-D) einen geringen Gehalt an phosphoryliertem Akt, wenn die Zellen mit AktVIII oder LY294002 behandelt wurden. Die Rapamycin-Behandlung führt zu einem deutlichen Anstieg der phospho-Akt-Menge. Der Gehalt an phosphoryliertem S6 ist durch die Behandlung mit AktVIII, LY294002 oder Rapamycin vergleichend zur Kontrollkondition deutlich vermindert. Die ERK1/2- Phosphorylierung ist durch die Behandlungen mit AktVIII, LY294002 oder Rapamycin positiv beeinflusst. In Analysen von COLO-699 Zellen (siehe Abb. 4-18E-F) ist nach Behandlung mit AktVIII oder LY294002 eine deutlich geringere Menge an phosphoryliertem Akt und phosphoryliertem S6 als in der Kontrolle erkennbar ($n = 2$). Die Rapamycin-Behandlung führt zu einem deutlich verminderten Gehalt an phosphoryliertem S6 und beeinflusst gleichzeitig die Akt-Phosphorylierung positiv ($n \geq 3$). Weiterhin induziert die Behandlung mit AktVIII, LY294002 oder Rapamycin eine leicht erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung ($n = 2$). In weiteren Analysen mit COLO 357 Zellen (nicht abgebildet) konnte ein geringer Gehalt an phosphoryliertem Akt unter Behandlung mit AktVIII ($n = 4$) oder LY294002 ($n = 4$) ermittelt werden. Unter dem Einfluss von Rapamycin blieb die Akt-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle unverändert ($n = 3$). Die S6-Phosphorylierung wurde in zwei Versuchen nach AktVIII-Behandlung deutlich negativ beeinflusst, während die Menge an phosphoryliertem S6 nach LY294002- oder Rapamycin-Behandlung unverändert

4. Ergebnisse

vorlag ($n \geq 2$). Die ERK1/2-Phosphorylierung wurde durch die Behandlung mit den Inhibitoren nicht beeinflusst ($n \geq 3$). In mikroskopischen Aufnahmen der analysierten Zellen konnten nach Behandlung mit AktVIII oder LY294002 im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen keine Unterschiede in der Zellmorphologie oder der Konfluenz beobachtet werden.



4. Ergebnisse

Abb. 4-18. Effekt von AktVIII, LY294002 und Rapamycin auf die Phosphorylierung von Akt, S6 und ERK1/2. Subkonfluente PANC-1, H23 und COLO-699 Zellen wurden für 15 h mit LY294002, AktVIII (beide je 10 μ M), Rapamycin (100 nM) oder DMSO (0.1 %) in DMEM ohne Zusätze behandelt. 50 μ g RIPA-Zelllysate wurden im Immunblotverfahren analysiert. Die Nachweise der analysierten Proteine erfolgte durch Verwendung spezifischer Antikörper wie in Kapitel 4.4 beschrieben. (A, C, E) Immunblot-Analysen der Phosphorylierung und Expression von Akt, S6 und ERK1/2 in PANC-1 (A), H23 (C) und COLO-699 (E) nach entsprechender Behandlung. (B, D, F) Quantifizierung der relativen Signalintensität entsprechender Immunblots. Es ist der Mittelwert der Signalintensität \pm SD angegeben. Die Signalintensität der Phosphorylierung wurde relativ zur Gesamtexpression des jeweiligen Proteins bestimmt. Alle so erhaltenen Werte wurden auf die Werte der DMSO-Behandlung (= 100 %) normiert (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; T-Test im Vergleich zur DMSO-Behandlung; PANC-1 $n = 2 - 4$; H23 $n = 3$; COLO-699 $n = 2 - 4$).

4.6.2 Analyse der Auswirkungen von AktVIII auf die Aktivität der drei Akt-Isoformen

Um die Wirksamkeit des Akt-Inhibitors AktVIII auf Akt1, Akt2 und Akt3 nachzuweisen, wurden Akt-Kinase-Assays durchgeführt.

Zur Bestimmung der Akt1- und Akt2-Aktivität nach AktVIII-Behandlung wurden PANC-1 Zellen aufgrund ihrer hohen induzierbaren Akt1- und Akt2-Aktivität (siehe Kapitel 4.5) für die Analysen ausgewählt. Die Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, mit AktVIII oder zum Vergleich mit LY294002 behandelt und anschließend mit EGF oder SC-79 inkubiert. Die Analyse der Akt1- und Akt2-Kinase-Aktivität erfolgte im *in vitro* Akt-Kinase-Assay, wie in Kapitel 4.5 beschrieben, nach Präzipitation von Akt1 aus 1000 μ g Lysat und Akt2 aus 500 μ g Lysat. Ein Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen ist in Abb. 4-19A dargestellt. Die Akt1- und Akt2-Aktivität ist nach AktVIII + EGF-Behandlung im Vergleich zur alleinigen EGF-Behandlung deutlich geringer. Nach LY294002 + EGF-Behandlung ist keine Akt1- und Akt2-Aktivität detektierbar. Der Akt-Nachweis im jeweils oberen Immunblot belegt eine vergleichbare Akt1- oder Akt2-Präzipitation aus den Lysaten. Anhand des phospho-Akt-Nachweises in korrespondierenden Gesamtlysaten, dargestellt im Immunblot in Abb. 4-19B, wird die Inhibition der Akt-Aktivität nach LY294002- und AktVIII-Behandlung bestätigt. Somit wird die Kinase-Aktivität von Akt1 und Akt2 durch AktVIII gehemmt.

Zur Bestimmung der Effekte von AktVIII auf die Akt3-Aktivität wurden H23 Zellen aufgrund ihrer hohen, induzierbaren Akt3-Aktivität ausgewählt. Die Zellen wurden, wie weiter oben beschrieben, mit AktVIII und EGF behandelt und die *in vitro* Kinase-Aktivität von Akt3, wie in Kapitel 4.5 beschrieben, analysiert. Die Auswertung eines exemplarischen Versuches (siehe Abb. 4-19C) zeigt, dass die EGF-induzierte Akt3-Aktivität nach Behandlung mit AktVIII + EGF nicht mehr detektierbar ist. Somit wird die Akt3-Aktivität durch AktVIII gehemmt. Die Analyse der Akt-Phosphorylierung in korrespondierenden Lysaten (siehe Immunblot in Abb. 4-19D) zeigt keine Akt-Phosphorylierung in AktVIII-behandelten Zellen und bestätigt die Inhibition der Akt-Aktivität.

4. Ergebnisse

In weiteren Assays mit COLO-699 Zellen konnte nach SC-79 + AktVIII-Behandlung keine Akt3-Aktivität nachgewiesen werden (nicht abgebildet, n = 2), während die alleinige SC-79-Behandlung diese deutlich induzierte. Insgesamt zeigen diese exemplarischen Versuche, dass die Kinase-Aktivität von Akt3 durch AktVIII inhibiert ist.

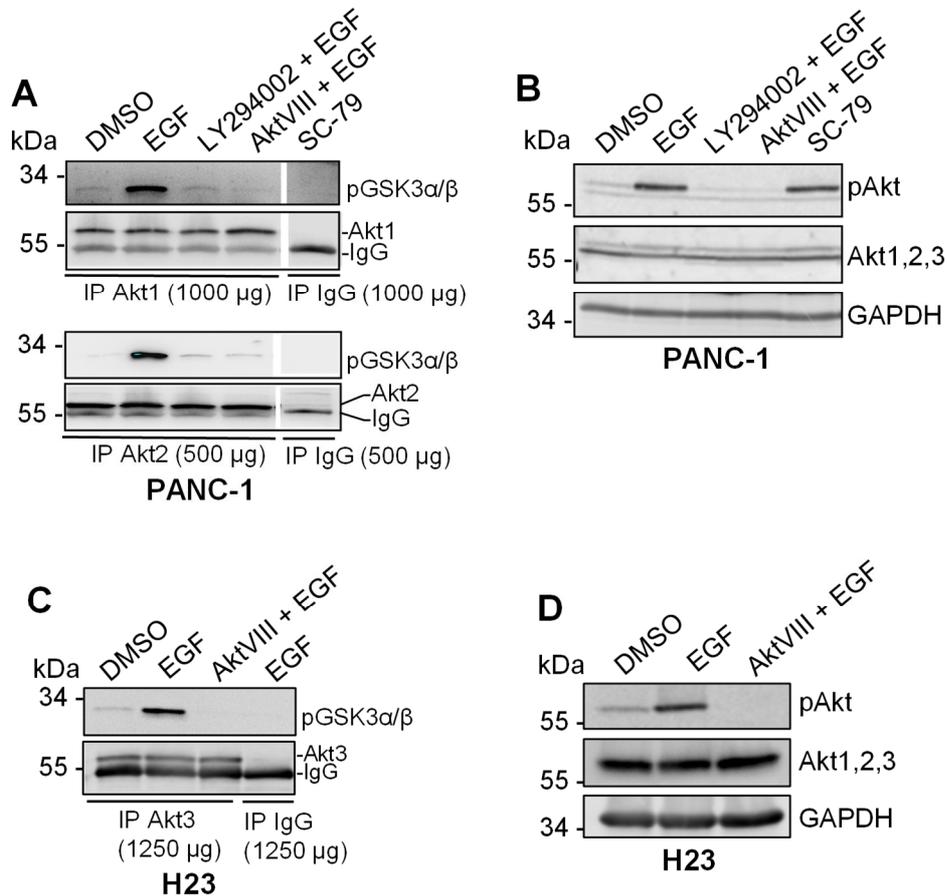


Abb. 4-19. Einfluss von AktVIII auf die Kinase-Aktivität von Akt1, Akt2 und Akt3. (A,C) Immunoblot-Analysen von *in vitro* Akt-Kinase-Assays, die mit NP-40-Lysaten von PANC-1 und H23 Zellen durchgeführt wurden. Subkonfluent gewachsene Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert, mit LY294002, AktVIII (je 10 μ M) oder DMSO (0.1 %) für 30 min vorbehandelt und anschließend mit EGF (30 ng/ml; 5 min), SC-79 (10 μ M; 30 min) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %; 30 min) behandelt. Die Kinase-Assays wurden wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben durchgeführt und ausgewertet. (PANC-1 n = 2; H23 n = 1). Die Nachweise der pGSK3 α/β und von Akt1,2,3 erfolgten in (A) mit ECL-Detektion oder AP-Detektion und in (C) mit Fluoreszenz-Detektion. (B,D) Immunoblot-Analysen der Akt-Phosphorylierung in PANC-1 und H23 NP-40-Lysaten. Der Nachweis von phospho-Akt, Akt1,2,3 und GAPDH erfolgte im Immunoblotverfahren unter Verwendung von 50 μ g Probe/Spur und Antikörpern, die spezifisch phospho-Akt (S473; #9271, Cell Signaling für PANC-1; #4060, Cell Signaling für H23), Akt1,2,3 oder GAPDH erkennen und Fluoreszenz-Detektion. Der GAPDH-Nachweis diente als Ladekontrolle (PANC-1 n = 4; H23 n = 1).

4.7 Die Bedeutung des Akt-mTOR-S6-Signalweges und der einzelnen Akt-Isoformen für die Zellmigration

4.7.1 Einfluss von SC-79 auf die Migration

Um den Einfluss der Akt-Kinasen auf die Migration von PANC-1, H23 und COLO-699 Zellen zu analysieren, wurde in *Wounding-Assays* der relative Wundverschluss der Zellen unter Einfluss des Akt-Aktivators SC-79 (1 μM und 10 μM) ermittelt. In den *Assays* wurden mit einer Pipettenspitze jeweils drei Spalten in konfluent gewachsene Zellen gekratzt und die Zellen in Medium mit reduziertem FCS-Gehalt mit SC-79 behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen mit DMSO behandelt. Die entstandenen Spalten wurden für die Dokumentation der Zellwanderung an insgesamt neun Stellen und zu drei Zeitpunkten (2 h nach dem *Wounding* = t_0 , 24 h = t_{24} , 48 h = t_{48}) mittels *live-cell imaging* aufgenommen. Abb. 4-20A-C zeigt repräsentative Aufnahmen der Zeitpunkte t_0 und t_{24} aus *Wounding-Assays* mit PANC-1, H23 und COLO-699 Zellen, die mit DMSO oder SC-79 (1 μM) behandelt wurden. Zur Ermittlung des relativen Wundverschlusses wurden die Spalten jeweils vermessen und der prozentuale Wundverschluss berechnet. Der relative Wundverschluss (24 h) von mindestens drei unabhängigen Versuchen wurde gemittelt und ist in Abb. 4-23D als Mittelwert \pm SEM im Balkendiagramm dargestellt. Die quantitative Auswertung dieser Versuche zeigt, dass PANC-1 Zellen den Spalt nach Behandlung mit SC-79 (1 μM) mit 60.2 ± 4.7 % (SEM; n = 3) im Vergleich zur DMSO-Behandlung mit 49.8 ± 3.2 % (n = 3) tendenziell etwas schneller verschließen. SC-79 (1 μM)-behandelte H23 Zellen zeigen eine geringfügig positiv veränderte Wundverschlussrate von 63.6 ± 8.1 % im Vergleich zu DMSO mit 49.5 ± 6.9 % (SEM; n = 3). COLO-699 Zellen verschließen den Spalt mit Zusatz von SC-79 (1 μM) zu 52.0 ± 10.2 % (SEM; n = 5) und mit DMSO zu 49.1 ± 8.7 % (SEM; n = 5) und zeigen somit keine Unterschiede in der Wundverschlussrate. Die Behandlung mit SC-79 (10 μM ; nicht abgebildet) beeinflusst den relativen Wundverschluss von PANC-1, H23 und von COLO-699 Zellen im Vergleich zur DMSO-Behandlung jeweils nicht maßgeblich (siehe Tabelle 10-2 im Anhang). Weiterhin wurden auch die Spalten zum Zeitpunkt t_{48} (nicht abgebildet) – wie weiter oben beschrieben – vermessen und der relative Wundverschluss berechnet. Diese Auswertung (siehe Tabelle 10-2 im Anhang) zeigt für die analysierten Zelllinien ähnliche Differenzen in der Wundverschlussrate nach SC-79- oder DMSO-Behandlung, wie nach 24 h. Einzig für H23 Zellen, welche mit SC-79 (10 μM) behandelt wurden, ist nach 48 h im Vergleich zur DMSO-Behandlung eine tendenziell verminderte Wundverschlussrate messbar. Somit beeinflusst die SC-79-Behandlung die Migrationsrate nicht maßgeblich. Eine Tendenz zu einer Migrationsinduktion ist anhand der Ergebnisse der SC-79-Behandlung (1 μM) nach 24 h von PANC-1 und H23 Zellen zu erkennen.

4. Ergebnisse

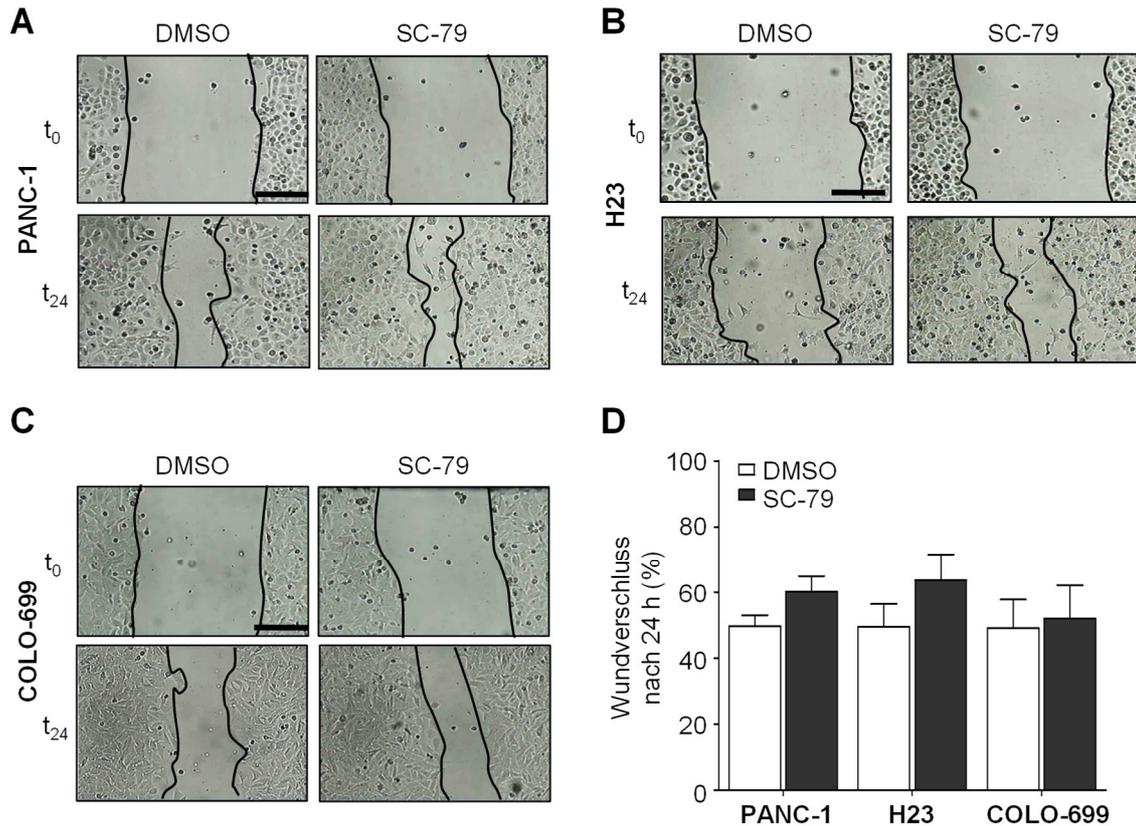


Abb. 4-20. Effekt von SC-79 auf die Zellmigration. Für *Wounding-Assays* wurde in konfluent gewachsene Zellen (PANC-1, H23 und COLO-699) mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Die Zellen wurden in Medium mit 1 % (PANC-1) oder 5 % FCS (H23, COLO-699) kultiviert und mit SC-79 (1 μ M) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. (A-C) Repräsentative Aufnahmen aus *Wounding-Assays*. Die Aufnahmen der Spalten wurden 2 h nach dem *Wounding* (t_0) und 24 h (t_{24}) danach aufgenommen (Maßstabsbalken = 250 μ m). (D) Quantifizierung des relativen Wundverschlusses nach 24 h. Der relative Wundverschluss wurde anhand von Messungen der Spaltbreiten zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 3 – 5).

4.7.2 Einfluss einer Akt-Inhibition auf die Migration

Um den Einfluss einer Akt-Inhibition auf die Migration zu untersuchen, wurden mit H23, COLO-699 und PANC-1 Zellen weitere *Wounding-Assays*, wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden zur Akt-Inhibition mit dem Akt-Inhibitor AktVIII behandelt.

Abb. 4-21A-C zeigt repräsentative Aufnahmen der Spalten zu den Zeitpunkten t_0 und t_{48} aus *Wounding-Assays* mit PANC-1, COLO-699 und H23 Zellen. Die Quantifizierung des relativen Wundverschlusses nach 48 h – ermittelt, wie in Kapitel 4.7.1. beschrieben (24 h Werte siehe Tabelle 10-3 im Anhang) – zeigt Folgendes: Der Wundverschluss von PANC-1 Zellen ist durch AktVIII-Behandlung mit 40.9 ± 12.6 % (SEM; n = 3) im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) mit 69.5 ± 6.0 % (SEM; n = 3) signifikant ($p \leq 0.05$, T-Test) reduziert.

4. Ergebnisse

Bei COLO-699 Zellen ist mit Zusatz von AktVIII ein signifikant reduzierter Wundverschluss von 35.1 ± 9.1 % (SEM; n = 5; $p \leq 0.001$, T-Test) vergleichend zur DMSO-Behandlung mit 71.8 ± 10.9 % (SEM; n = 5) festzustellen. In einem Assay mit H23 Zellen lösten diese sich innerhalb von 24 h - 48 h nach AktVIII-Behandlung (10 μ M) teilweise von der Plastikoberfläche des Kulturgefäßes ab. Deshalb wurde die Konzentration von AktVIII in *Wounding-Assays* mit H23 Zellen um die Hälfte reduziert. Die quantitative Auswertung dieser Assays zeigt, dass der Wundverschluss nach AktVIII-Behandlung (5 μ M) mit 61.7 ± 4.2 % (SEM; n = 3) im Vergleich zur Kontrollkondition mit 67.7 ± 7.0 % (SEM; n = 3) unverändert vorliegt.

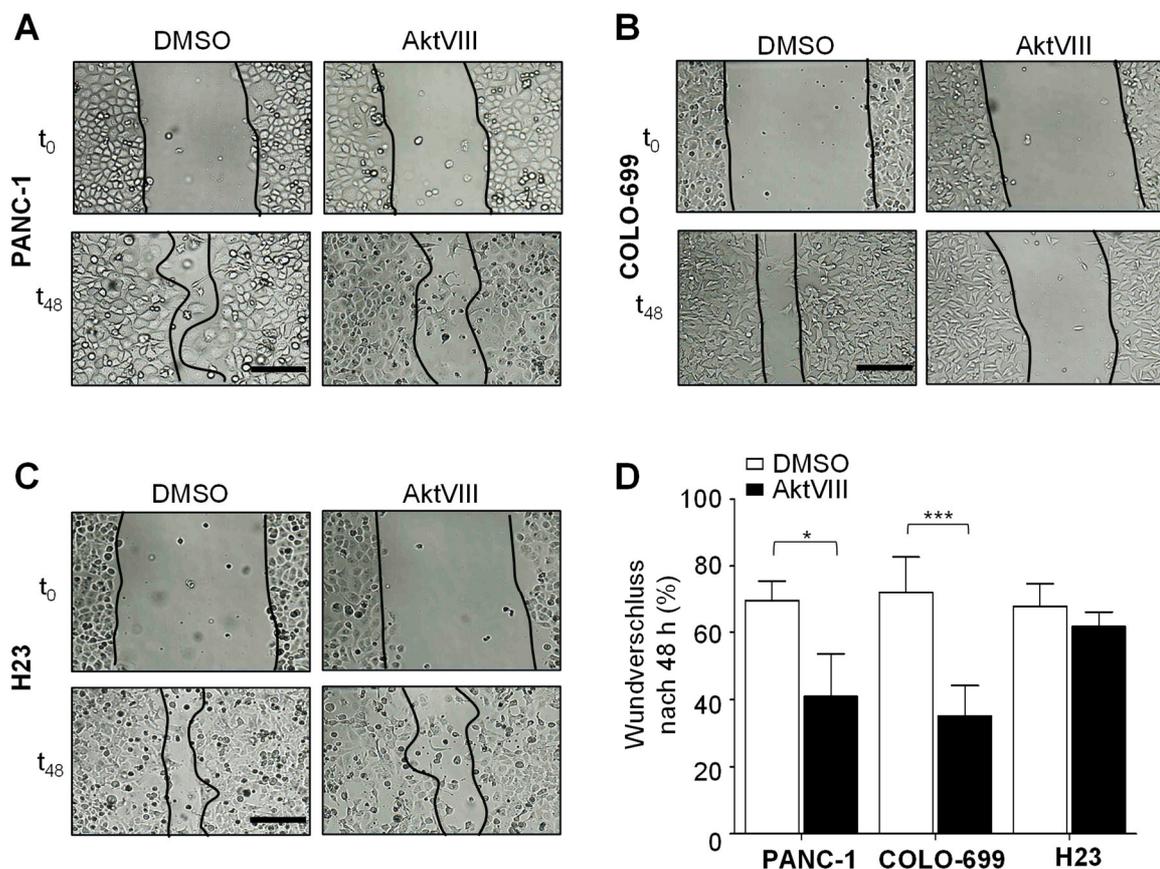


Abb. 4-21. Effekt von AktVIII auf die Zellmigration. Für *Wounding-Assays* wurde in konfluent gewachsene Zellen (PANC-1, H23 und COLO-699) mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Die Zellen wurden in Medium mit 1% (PANC-1) oder 5 % FCS (H23, COLO-699) kultiviert und mit AktVIII (10 μ M; 5 μ M für H23) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. (A-C) Repräsentative Aufnahmen aus *Wounding-Assays*. Die Fotos der Spalten wurden 2 h nach dem *Wounding* (t_0) und 48 h (t_{48}) danach aufgenommen (Maßstabsbalken = 250 μ m). (D) Quantifizierung des relativen Wundverschlusses nach 48 h. Der relative Wundverschluss wurde anhand von Messungen der Spaltbreite zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert \pm SEM angegeben (H23, PANC-1 n = 3; COLO-699 n = 5; * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$ im Vergleich zur DMSO-Behandlung; T-Test).

4. Ergebnisse

4.7.3 Einfluss einer mTOR-Inhibition auf die Migration

Bisher ist nur ansatzweise untersucht, welche Akt-Effektoren in der Migration von Lungenkarzinomzelllinien eine Rolle spielen. Für den Akt-Effektor mTOR und dessen indirektes Substrat S6 wurde bereits eine pro-migratorische Funktion nachgewiesen [111,112]. Zur Analyse des Einflusses von mTOR in der Migration wurden *Wounding-Assays*, wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben, mit H23 und COLO-699 Zellen nach Rapamycin-Behandlung durchgeführt. In Abb. 4-22A sind repräsentative Aufnahmen aus den *Assays* gezeigt. Die Quantifizierung des Wundverschlusses nach 48 h ist in Abb. 4-22B im Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt (24 h Werte siehe Tabelle 10-4 im Anhang). Die Auswertung zeigt, dass Rapamycin-behandelte H23 Zellen die Wunde mit 90.2 ± 6.6 % (SEM; n = 3) signifikant ($p \geq 0.05$; T-Test) schneller als die DMSO-behandelten Zellen mit 67.7 ± 7.0 % (SEM; n = 3) verschließen. Die Rapamycin-Behandlung von COLO-699 Zellen führt zu einem Wundverschluss von 64.9 ± 9.8 % (SEM; n = 3) und ist im Vergleich zur Kontrolle mit 76.2 ± 7.7 % (SEM; n = 3) tendenziell reduziert.

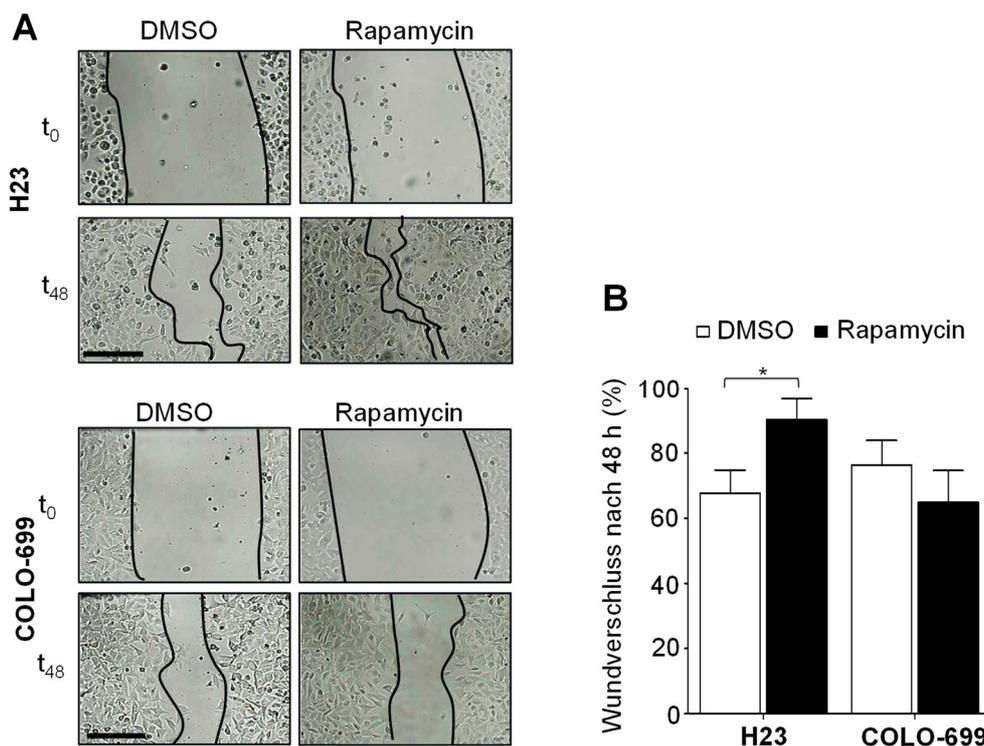


Abb. 4-22. Effekt von Rapamycin auf die Zellmigration. Für *Wounding-Assays* wurde in konfluent gewachsene Zellen (H23 und COLO-699) mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Die Zellen wurden in Medium mit 5 % FCS kultiviert und mit Rapamycin (100 nM) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. (A) Repräsentative Aufnahmen aus *Wounding-Assays*. Die Fotos der Spalten wurden 2 h nach dem *Wounding* (t_0) und 48 h (t_{48}) danach aufgenommen (Maßstabsbalken = 250 μ m). (D) Quantifizierung des relativen Wundverschlusses nach 48 h. Der relative Wundverschluss wurde anhand von Messungen der Spaltbreite zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 3; * $p \leq 0.05$ im Vergleich zur DMSO-Behandlung; T-Test).

4. Ergebnisse

4.7.4 Die Funktion von Akt1, Akt2 und Akt3 in der Migration

In verschiedensten Studien wurde nachgewiesen, dass Akt1, Akt2 und Akt3 Zelllinien-abhängig eine spezifische Funktion in der Migration einnehmen [63,79,86,97,113]. Die Funktion der einzelnen Akt-Isoformen in der Migration von Lungen- und Pankreas-karzinomzellen ist bisher nicht näher charakterisiert. Aufbauend auf früheren Studien der Arbeitsgruppe [32] wurde die individuelle Rolle von Akt1, Akt2 und Akt3 in der Migration von zwei PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Klonen und von PANC-1, H23 sowie COLO-699 Zellen analysiert. Für die Versuche sollten Akt1, Akt2 oder Akt3 durch siRNA-vermittelte Depletion inhibiert und die Zellmigration anschließend in *Wounding-Assays* – wie in Abschnitt 4.7.1 beschrieben – analysiert werden. Als Kontrolle dienten siScrbld-transfizierte Zellen.

Um den Zeitpunkt der stärksten siRNA-vermittelten Depletion von Akt1-3 zu ermitteln, wurde zuerst die Wirksamkeit der siRNAs in Zeitreihen getestet. Dazu wurden PANC-1 und H23 Zellen mit siAkt2 bzw. siAkt3 transfiziert und die Expression von Akt2 und Akt3 über einen Zeitraum von 48-120 h im Immunblotverfahren analysiert. Im Immunblot mit PANC-1 Zelllysaten ist im Zeitraum von 72-120 h mit mehr als 80 % die beste Effizienz der Depletion von Akt2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle detektierbar. In H23 Zellen ist im Zeitraum von 72-96 h mit mehr als 80 % ebenso die höchste Effizienz der Akt3-Depletion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisbar (siehe Abb. 10-1 im Anhang). Aufgrund dessen wurde der Zeitpunkt 54 h nach siRNA-Transfektion für den Zeitpunkt des *Woundings* gewählt.

In Abb. 4-23 sind repräsentative Aufnahmen der Zeitpunkte t_0 und t_{48} aus *Wounding-Assays* mit PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.1 Zellen gezeigt, welche mit siAkt1, siAkt2 oder siAkt3 behandelt wurden. Außerdem ist die quantitative Auswertung der Versuche mit PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.1 und -4.4 im Balkendiagramm als zurückgelegte Strecke/24 bzw. 48 h \pm SEM pro Wundrand dargestellt (Übersicht aller Werte siehe Tabelle 10-9 im Anhang). Es wurde die zurückgelegte Strecke ermittelt, da die Auswertung der Spalte über die Software Fiji automatisiert durchgeführt wurde und dabei die Spaltfläche pro Bildausschnitt ermittelt wurde. Diese Auswertung ermöglicht keine Bestimmung des relativen Wundverschlusses. Die Auswertung zeigt, dass siAkt1- oder siAkt2-transfizierte Zellen im Vergleich zu siScrbld-transfizierten Zellen eine kürzere Strecke zurücklegen. Dabei wird nach Behandlung mit siAkt1 die Migration des Klons -4.1 mit $79.9 \pm 7.4 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ (SEM; $n = 3$) im Vergleich zur Kontrolle mit $108.9 \pm 5.2 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ (SEM; $n = 3$) auf das 0.7-fache reduziert und die des Klons -4.4 mit $68.6 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ ($n = 2$) im Vergleich zur Kontrolle mit $80.2 \pm 8.7 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ (SEM; $n = 3$) auf das 0.8-fache.

4. Ergebnisse

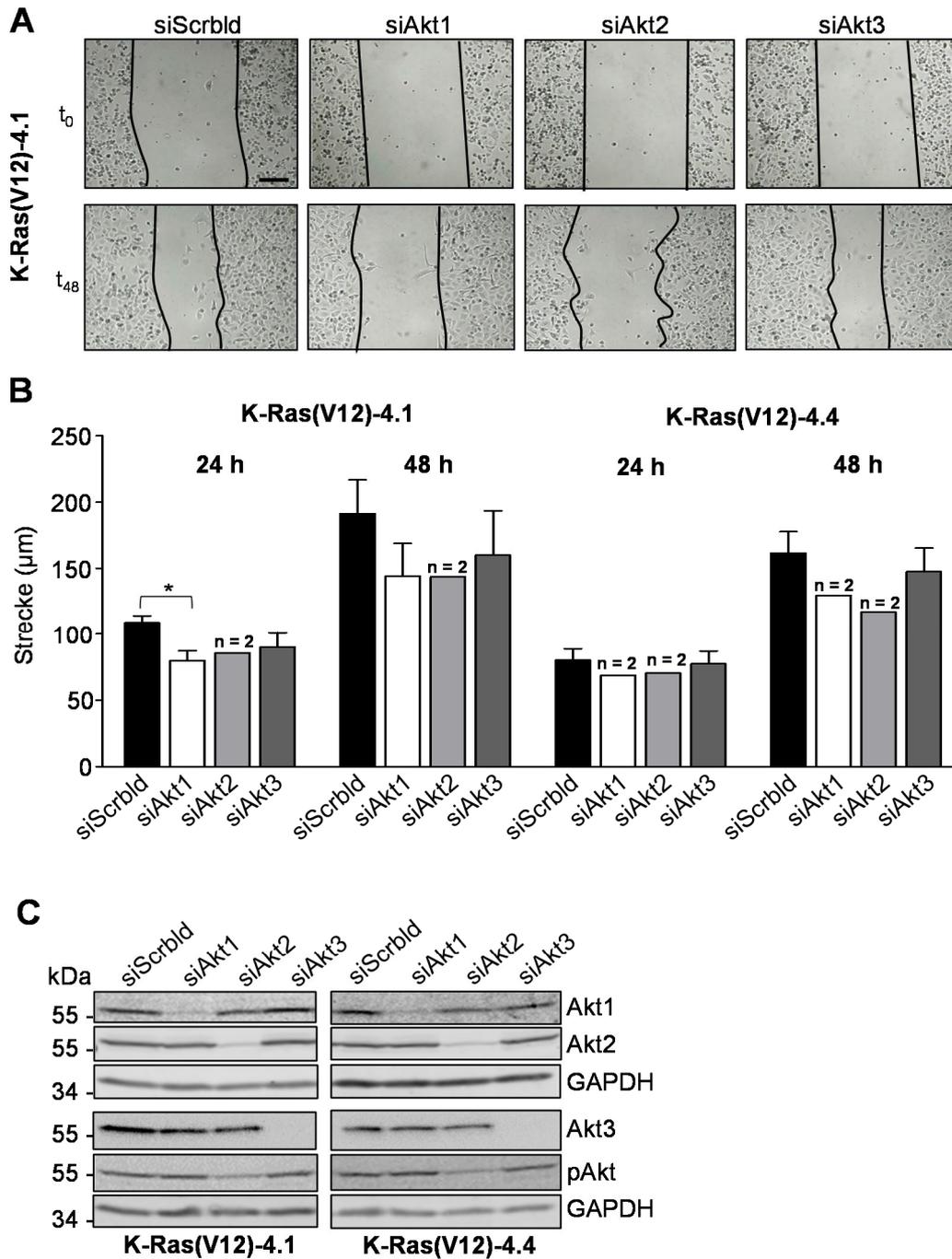


Abb. 4-23. Effekte einer Akt1-, Akt2- und Akt3-Depletion auf die Zellmigration von PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Zellklonen. Für *Wounding-Assays* wurden PANC-1/EGFP-K-Ras(V12) Zellen des Klons -4.1 und -4.4 mit 50 nM *Smartpool* siAkt1, siAkt2, siAkt3 oder Kontroll-siRNA (siScrblid) transfiziert und 54 h danach mit einer Pipettenspitze eine Wunde in die konfluent gewachsenen Zellen gekratzt. Die Zellen wurden in DMEM + 1 % FCS kultiviert. Die Fotos der Spalten wurden 2 h nach dem *Wounding* (t_0), 24 h (t_{24}) und 48 h (t_{48}) danach aufgenommen. (A) Repräsentative Aufnahmen aus *Wounding-Assays* (Maßstabsbalken = 250 µm). (B) Quantifizierung der gewanderten Strecke nach 24 h und 48 h. Die gewanderte Strecke pro Wundrand wurde anhand von Messungen der Spaltfläche zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n = 2 - 3$; $*p \leq 0.05$, T-Test im Vergleich zu siScrblid). (C) Immunblot-Analysen der Akt-Isoform-Expression 102 h nach Transfektion mit siRNA. Nach den *Wounding-Assays* wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert und je 50 µg Lysat im Immunblotverfahren auf den Akt1-, Akt2-, Akt3-Gehalt, die Akt-Phosphorylierung und GAPDH mit spezifischen Antikörpern, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, analysiert ($n = 2 - 3$).

4. Ergebnisse

Die Behandlung mit siAkt2 führt zum Zeitpunkt 48 h beim Klon -4.1 mit einer gewanderten Strecke von $143.6 \mu\text{m}$ ($n = 2$) und beim Klon -4.4 mit $117.0 \mu\text{m}$ ($n = 2$) im Vergleich zur Kontrolle mit $191.4 \pm 25.5 \mu\text{m}$ bzw. $161.6 \pm 16.1 \mu\text{m}$ (SEM; $n = 3$) zu einer Reduktion auf das 0.7-fache. Die gewanderte Strecke von siAkt3-transfizierten Zellen ist im Vergleich zu den Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, nach 24 h und 48 h nicht maßgeblich verändert (siehe dazu Tabelle 10-9 im Anhang). Die Zellen wurden im Anschluss an die *Wounding-Assays* lysiert und die Expression der Akt-Isoformen sowie die Akt-Phosphorylierung analysiert. Die in Abb. 4-23C gezeigten Immunblots bestätigen die Wirksamkeit von siAkt1, siAkt2 und siAkt3. Es ist im Vergleich zur siScrbld-Transfektion jeweils ein deutlich reduzierter Gehalt von Akt1, Akt2 oder Akt3 auf 10-20 % bei Verwendung der jeweils spezifischen siRNA erkennbar. Die Expression der jeweils anderen beiden Akt-Isoformen bleibt unverändert. Weiterhin ist nach Akt2-Depletion im Vergleich zur Kontrolle ein geringerer Gehalt an phosphoryliertem Akt feststellbar. Somit kann angenommen werden, dass die spezifische Depletion von Akt1-3 jeweils über den Zeitraum des *Wounding-Assays* erfolgt ist.

Die quantitative Auswertung der *Wounding-Assays* mit PANC-1 Zellen zeigt Folgendes (Abb. 4-24B): PANC-1 Zellen, welche mit siAkt1 transfiziert wurden, legen nach 24 h eine Strecke von $94.8 \pm 14.8 \mu\text{m}$ (SEM; $n = 3$) zurück. Diese ist im Vergleich zu siScrbld-transfizierten Zellen mit $145.3 \pm 16.6 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ (SEM; $n = 3$) signifikant ($p \leq 0.05$, T-Test) reduziert. Weder die Transfektion mit siAkt2 ($128.6 \mu\text{m}/24 \text{ h}$; $n = 2$) noch mit siAkt3 ($113 \mu\text{m}/24 \text{ h}$; $n = 2$) beeinflussen die Zellwanderung im Vergleich zur Kontrolle maßgeblich. Diese Ergebnisse sind auch anhand der repräsentativen Aufnahmen der Spalten zu den verschiedenen Zeitpunkten in Abb. 4-24A zu erkennen. Die Bestimmungen der gewanderten Strecke nach 48 h ergaben im Vergleich zu den 24 h Werten vergleichbare Differenzen in der gewanderten Strecke: siScrbld = $228.7 \pm 20.3 \mu\text{m}$ (SEM, $n = 3$), siAkt1 = $166.6 \pm 32.7 \mu\text{m}$ (SEM, $n = 3$), siAkt2 = $210.6 \mu\text{m}$ ($n = 2$), siAkt3 = $195.0 \mu\text{m}$ ($n = 2$).

4. Ergebnisse

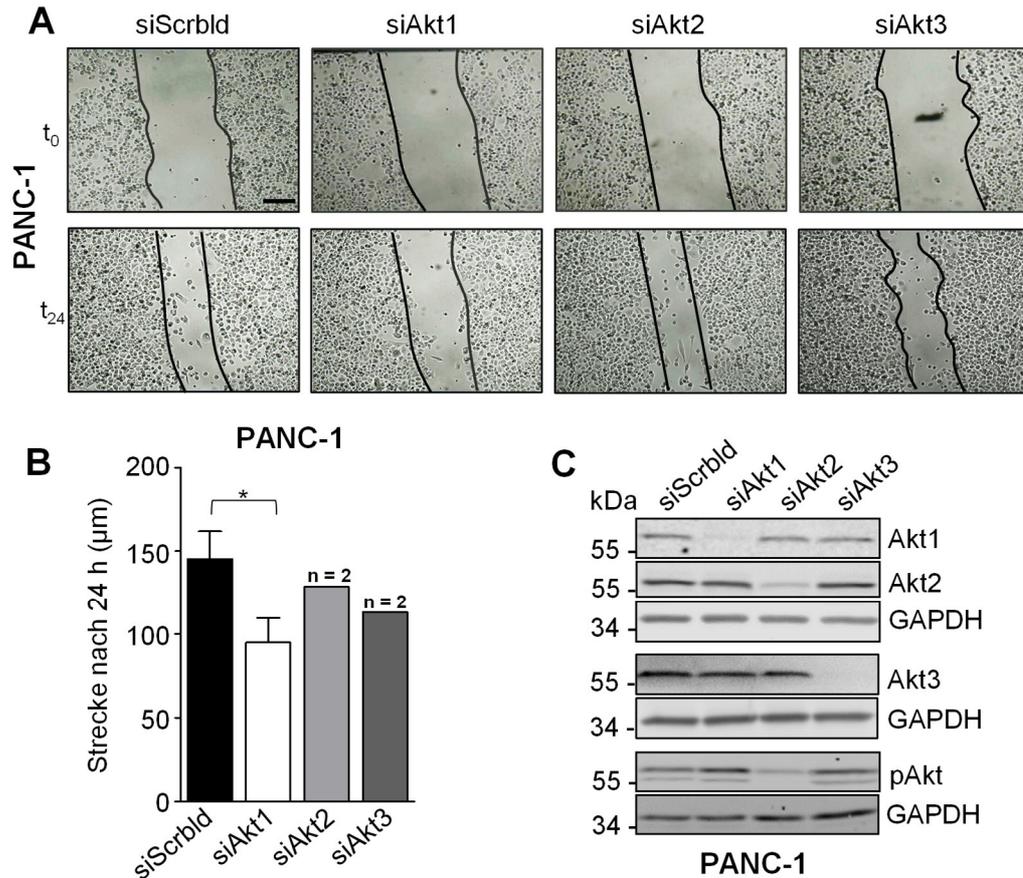


Abb. 4-24. Effekte einer Akt1-, Akt2- und Akt3-Depletion auf die Zellmigration von PANC-1 Zellen. Für *Wounding-Assays* wurden PANC-1 Zellen mit 50 nM *Smartpool* siAkt1, siAkt2, siAkt3 oder Kontroll-siRNA (siScrbl) transfiziert und 54 h danach mit einer Pipettenspitze eine Wunde in die konfluenten Zellen gekratzt. Die Zellen wurden in DMEM + 1 % FCS kultiviert. Die Fotos der entstandenen Spalten wurden 2 h nach dem *Wounding* (t_0), 24 h (t_{24}) und 48 h (t_{48}) danach aufgenommen. (A) Repräsentative Aufnahmen aus *Wounding-Assays* (Maßstabsbalken = 250 μm). (B) Quantifizierung der gewanderten Strecke nach 24 h. Die gewanderte Strecke pro Wundrand wurde anhand von Messungen der Spaltfläche zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 2 - 3; *p \leq 0.05, T-Test im Vergleich zu siScrbl). (C) Immunblot-Analysen der Akt-Isoform-Expression nach siRNA-vermittelter Depletion. Nach den *Wounding-Assays* wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert und je 50 μg Lysat im Immunblotverfahren auf die Expression von Akt1, Akt2, Akt3, die Akt-Phosphorylierung und GAPDH mit spezifischen Antikörpern, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, analysiert (n = 2 - 3).

4. Ergebnisse

Die Auswertung der Versuche mit H23 Zellen ist in Abb. 4-25 durch repräsentative Aufnahmen aus einem Versuch und der Quantifizierung der gewanderten Strecke nach 24 h ($n = 2-3$) im Balkendiagramm gezeigt (48 h Werte siehe Tabelle 10-9 im Anhang). Die Auswertung zeigt, dass siAkt1-behandelte Zellen mit $127.7 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ ($n = 2$) tendenziell eine kürzere Strecke im Vergleich zu siScrbld-transfizierten Zellen ($141.7 \pm 9.7 \mu\text{m}/24 \text{ h}$, SEM; $n = 3$) zurücklegen. Nach Transfektion mit siAkt2 migrieren H23 Zellen mit $165.3 \pm 33.4 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ (SEM; $n = 3$) tendenziell etwas schneller als siScrbld-transfizierte Zellen. Die Transfektion mit siAkt3 beeinflusst die gewanderte Strecke von H23 Zellen im Vergleich zur Kontrollkondition mit $148.3 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ ($n = 2$) nicht.

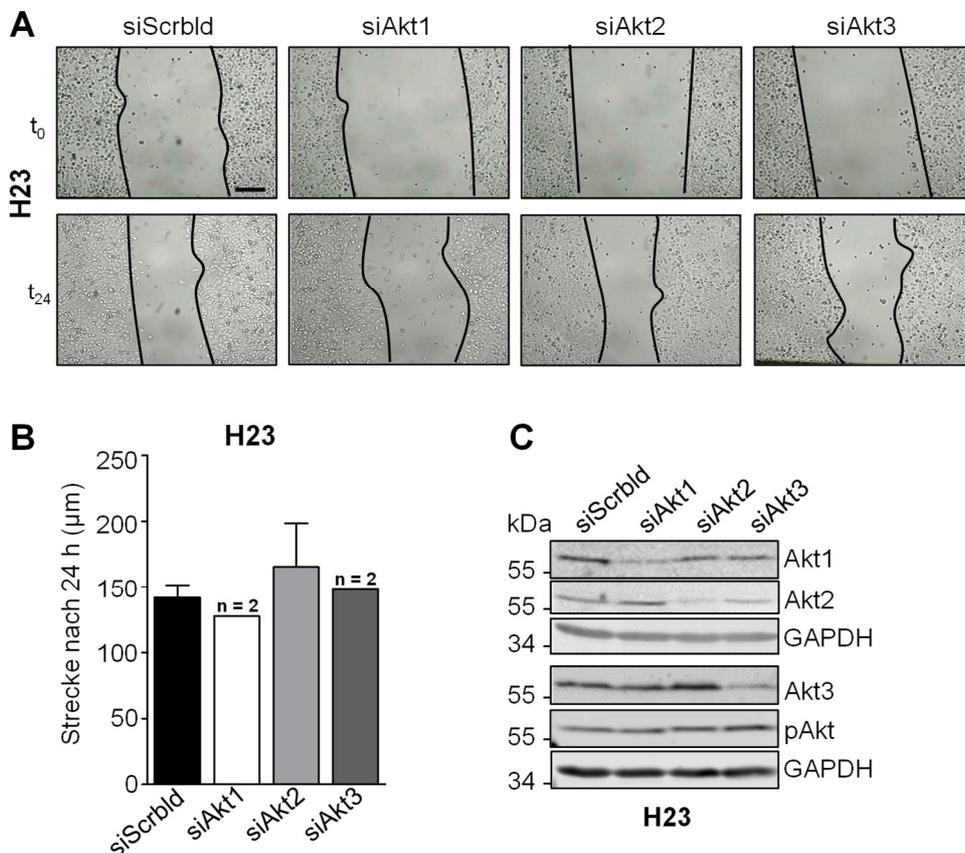


Abb. 4-25. Effekte einer Akt1-, Akt2- und Akt3-Depletion auf die Zellmigration von H23 Zellen. Für *Wounding-Assays* wurden H23 Zellen mit 50 nM *Smartpool* siAkt1, siAkt2, siAkt3 oder Kontroll-siRNA (siScrbld) transfiziert und 54 h danach mit einer Pipettenspitze eine Wunde in die konfluent gewachsenen Zellen gekratzt. Die Zellen wurden in DMEM + 5 % FCS kultiviert. Die Fotos der entstandenen Spalte wurden 2 h nach dem *Wounding* (t_0), 24 h (t_{24}) und 48 h (t_{48}) danach aufgenommen. (A) Repräsentative Aufnahmen aus *Wounding-Assays* (Maßstabsbalken = 250 μm). (B) Quantifizierung der gewanderten Strecke nach 24 h. Die gewanderte Strecke pro Wundrand wurde anhand von Messungen der Spaltfläche zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n = 2 - 3$). (C) Immunblot-Analysen der Akt-Isoform-Expression nach siRNA-vermittelter Depletion. Nach den *Wounding-Assays* wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert und je 50 μg Lysat im Immunblotverfahren auf die Expression von Akt1, Akt2, Akt3, die Akt-Phosphorylierung und GAPDH mit spezifischen Antikörpern, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, analysiert ($n = 2 - 3$).

4. Ergebnisse

Die Auswertung der Versuche mit COLO-699 Zellen zeigt, dass diese Zellen in vier unabhängigen Versuchen nach Transfektion mit siAkt1, siAkt2 oder siAkt3 im Vergleich zur siScrbld-Transfektion in etwa gleich weit wandern. Dies ist anhand der abgebildeten repräsentativen Aufnahmen aus einem Versuch in Abb. 4-26A und anhand der Quantifizierung der gewanderten Strecke nach 24 h in Abb. 4-26B im Balkendiagramm zu erkennen. Die Berechnungen der gewanderten Strecke, angegeben als Mittelwert \pm SEM, ergaben, dass die Zellen mit siScrbld = $125.4 \pm 23.9 \mu\text{m}/24 \text{ h}$, mit siAkt1 = $126.1 \pm 10.0 \mu\text{m}/24 \text{ h}$, mit siAkt2 = $141.3 \pm 22.3 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ und mit siAkt3 = $143.5 \pm 21.3 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ wandern (48 h Werte siehe Tabelle 10-9 im Anhang).

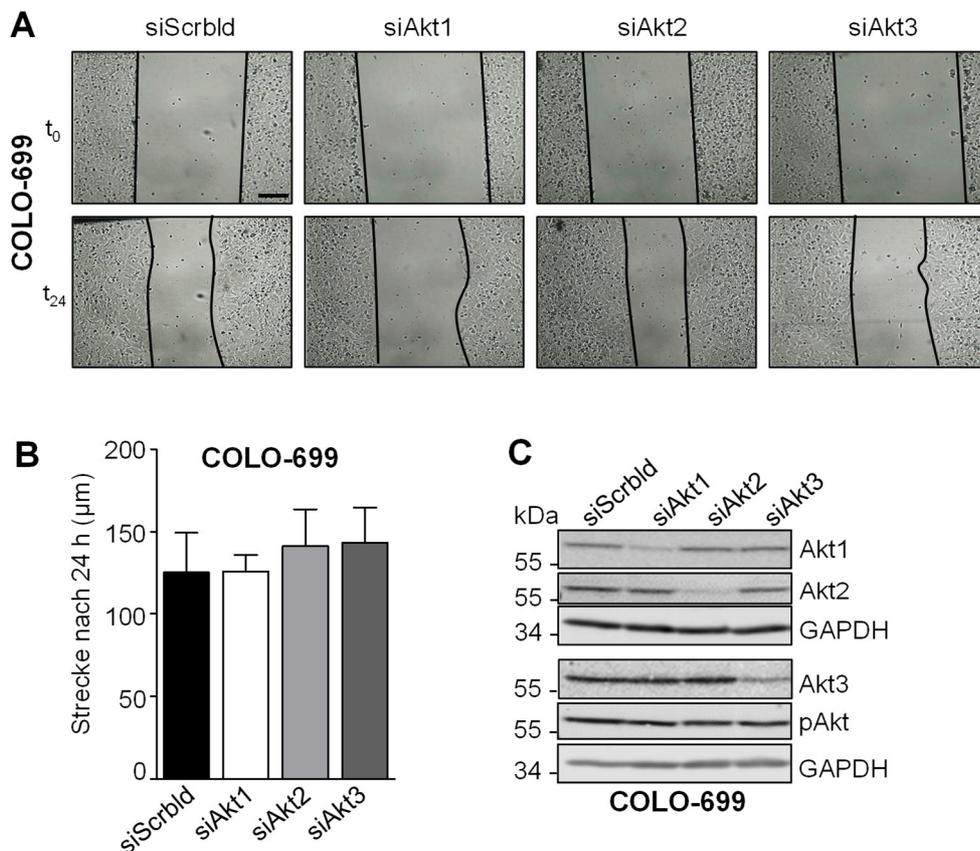


Abb. 4-26. Effekte einer Akt1-, Akt2- und Akt3-Depletion auf die Zellmigration von COLO-699 Zellen. Für *Wounding-Assays* wurden COLO-699 Zellen mit 50 nM *Smartpool* siAkt1, siAkt2, siAkt3 oder Kontroll-siRNA (siScrbld) transfiziert und 54 h danach mit einer Pipettenspitze eine Wunde in die konfluent gewachsenen Zellen gekratzt. Die Zellen wurden in DMEM + 5 % FCS kultiviert. Die Fotos der entstandenen Spalten wurden 2 h nach dem *Wounding* (t_0), 24 h (t_{24}) und 48 h (t_{48}) danach aufgenommen. (A) Repräsentative Aufnahmen aus *Wounding-Assays* (Maßstabsbalken = 250 μm). (B) Quantifizierung der gewanderten Strecke nach 24 h. Die gewanderte Strecke pro Wundrand wurde anhand von Messungen der Spaltfläche zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n = 4$). (C) Immunblot-Analysen der Akt-Isoform-Expression nach siRNA-vermittelter Depletion. Nach den *Wounding-Assays* wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert und je 50 μg Lysat im Immunblotverfahren auf die Expression von Akt1, Akt2, Akt3, die Akt-Phosphorylierung und GAPDH mit spezifischen Antikörpern, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, analysiert ($n = 4$).

4. Ergebnisse

Zur Kontrolle der Wirksamkeit der siRNAs wurden die Zellen nach den *Wounding-Assays* jeweils lysiert und die Expression von Akt1, Akt2 und Akt3 als auch die Akt-Phosphorylierung im Immunblotverfahren analysiert. Repräsentative Immunblots sind in Abb. 4-24C, 4-25C und 4-26C dargestellt. In PANC-1 und H23 Zellen ist nach Einsatz von siAkt1 ein deutlich geringerer Gehalt von Akt1 – vermindert um 80-90 % – im Vergleich zur Kontrolle (siScrbld) detektierbar. Dies gilt für Akt2 und Akt3 ebenso nach Verwendung von siAkt2 bzw. siAkt3. In COLO-699 Zellen ist im Vergleich zur Kontrolle ein 60-70 % verminderter Akt1-Gehalt nach Transfektion mit siAkt1 detektierbar. Dies ergibt sich für Akt2 und Akt3 nach Transfektion mit siAkt2 bzw. siAkt3 ebenso. In PANC-1 Zellen ist nach Einsatz von siAkt2 eine reduzierte Akt-Phosphorylierung nachweisbar. In H23 und COLO-699 Zellen bleibt die Akt-Phosphorylierung unabhängig von der verwendeten siRNA gleich. Somit kann angenommen werden, dass die Depletion der Akt-Isoformen über den Zeitraum der *Wounding-Assays* erfolgte.

Zusammenfassend führte die Depletion von Akt1 zu einer reduzierten Migration von PANC-1 Zellen. In H23 Zellen ist die Migration tendenziell einzig nach Akt1-Depletion negativ beeinflusst. Die Migration von COLO-699 Zellen wird durch die Depletion der einzelnen Akt-Isoformen nicht beeinflusst.

4.8 Einfluss von MDM2 und p53 auf Akt-abhängige Signalwege und die Migration

In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte nach Inhibition des etablierten Akt-Effektors MDM2 eine verminderte Migration von PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Klonen nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Rolle von MDM2 und dessen direkten Interaktionspartner p53 in der Migration von Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien analysiert.

4.8.1 Analyse des TP53-Mutationsstatus

Da in den meisten humanen Tumoren p53-Mutationen festgestellt werden können [114], wurde zuerst eine Datenbankrecherche auf bekannte Mutationen in *TP53* in ausgewählten Zelllinien mithilfe des TRON *cell line portals* [102] durchgeführt (siehe Tabelle 4-2). Die Analyse ergab für die Zelllinien COLO-699, H23 und PANC-1 jeweils mehrere bekannte p53-Punktmutationen, welche als *Missense*-Mutationen beschrieben sind. Für AsPC1 ist eine Deletionsmutation an C135 beschrieben, die zu einem *Frameshift* führt.

4. Ergebnisse

Tabelle 4-2: TP53-Mutationsstatus ausgewählter Zelllinien. Datenbankrecherche mithilfe des TRON *cell line portals* [102]. mt = mutiert, wt = Wildtyp; fs = *Frameshift*.

Zelllinie	TP53		
	Status	Stelle	Typ
COLO-699	mt	R248Q; R116Q; R209Q	<i>Missense</i>
H23	mt	M246I; M207I; M114I	<i>Missense</i>
PANC-1	mt	R273H; R141H; R234H	<i>Missense</i>
AsPC1	mt	C135fs	Deletion

4.8.2 Expression von p53 und MDM2

Um zu analysieren, ob sich die jeweiligen p53-Mutationen auf den Gehalt von p53 oder MDM2 auswirken, wurde die Expression dieser beiden Proteine im Immunblotverfahren, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, in diesen Zelllinien analysiert. Die Analyse zeigt (Abb. 4-27A), dass p53 in PANC-1, PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.4, H23 und COLO-699 in etwa gleicher Menge exprimiert wird. Die p53-Bande in H23 Zellen ist leicht nach oben verschoben. In AsPc-1 Zellen ist p53 nicht detektierbar. Der MDM2-Gehalt ist in PANC-1, PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.4 und COLO-699 auf vergleichbarem Niveau. H23 Zellen exprimieren im Vergleich dazu deutlich mehr MDM2. In AsPc1 Zellen kann MDM2 nicht detektiert werden.

4.8.3 Effekt von Nutlin-3 und Pifithrin- α auf MDM2, p53 und den Akt-S6-Signalweg

Um die Aktivität von MDM2 und p53 zu hemmen, wurden die spezifischen Inhibitoren Nutlin-3 und Pifithrin- α verwendet. Nutlin-3 bindet direkt an MDM2 und blockiert dessen Interaktion mit p53. Außerdem wird MDM2 durch gebundenes Nutlin-3 stabilisiert und akkumuliert aufgrund dessen im Zytosol [116]. Der Wirkmechanismus von Pifithrin- α ist nicht vollständig aufgeklärt. Diese Substanz soll jedoch die transkriptionelle Aktivität von p53 im Zellkern inhibieren [117]. Um die Wirksamkeit der Inhibitoren Nutlin-3 und Pifithrin- α sowie deren Auswirkung auf die Akt-abhängige Signaltransduktion zu analysieren, wurden H23, COLO-699 und PANC-1 unter gleichen Bedingungen, wie in Kapitel 4.6. beschrieben, mit den Inhibitoren behandelt und im Immunblotverfahren analysiert. Eine Quantifizierung der Signalintensitäten kann Tabelle 10-5 und 10-6 im Anhang entnommen werden. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels β -Aktin- oder GAPDH-Nachweis auf allen Immunblots kontrolliert (teilweise dargestellt).

4. Ergebnisse

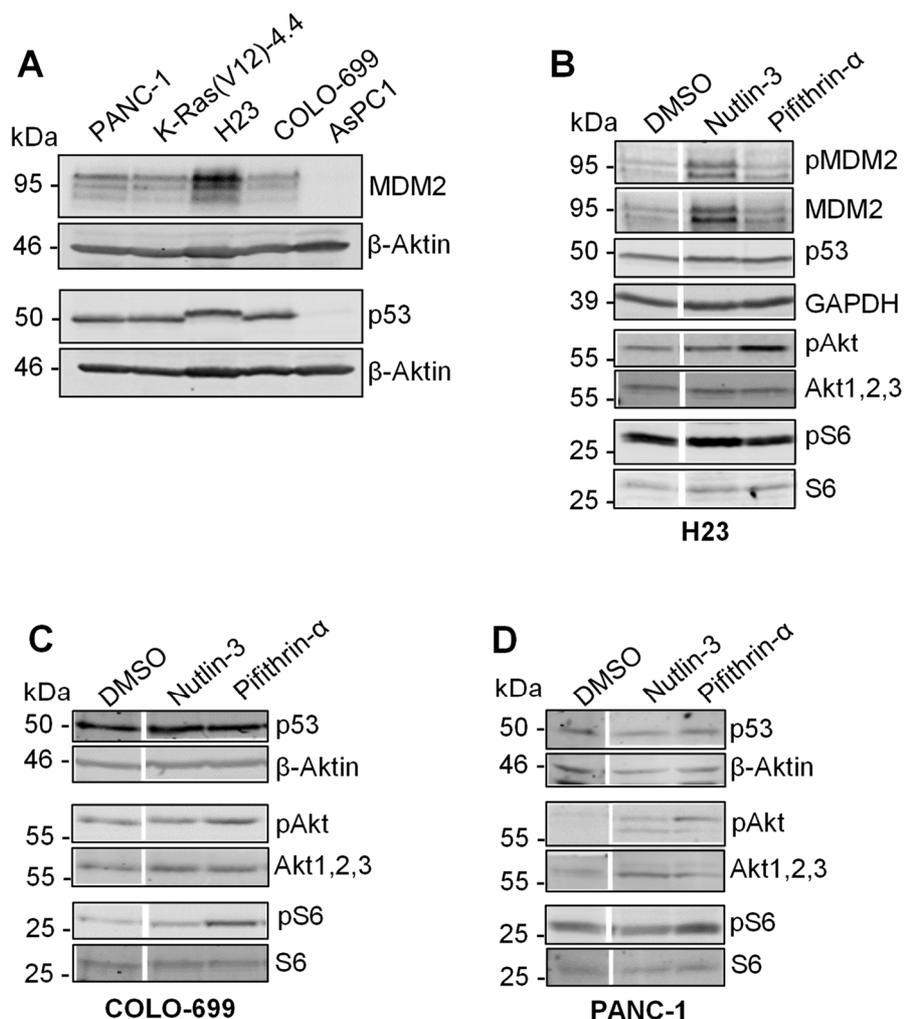


Abb. 4-27. (A) Analyse der p53- und MDM2-Expression. Repräsentative Immunblot-Analysen der p53- und MDM2-Expression aus RIPA-Zellysaten von konfluent gewachsenen PANC-1, PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.4, H23, COLO-699 und AsPC1 Zellen (n = 3). **(B-D) Einfluss von Pifithrin-α und Nutlin-3 auf MDM2, p53, Akt und S6.** Repräsentative Immunblot-Analysen von subkonfluent gewachsenen H23, COLO-699 und PANC-1 Zellen, die 15 h in DMEM ohne Zusätze mit Nutlin-3 (10 μM), Pifithrin-α (25 μM) oder DMSO (0.1 %) als Kontrolle behandelt und in RIPA-Puffer lysiert wurden. (A-D) Die Expression von MDM2, p53 und β-Aktin sowie die S6- und Akt-Phosphorylierung wurden im Immunblotverfahren in 50 μg RIPA-Zellysaten mit spezifischen Antikörpern, wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben, analysiert. Die Detektion von β-Aktin oder GAPDH diente als Ladekontrolle (H23 n = 2 für pMDM2/MDM2-Nachweis, weitere Nachweise n = 3, COLO-699 und PANC-1 n = 3 – 4).

Dem repräsentativen Immunblot mit H23 Zellen (Abb. 4-27B) ist zu entnehmen, dass die Nutlin-3-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle in einer deutlich erhöhten MDM2-Menge resultiert. Die Pifithrin-α- und Nutlin-3-Behandlung beeinflussen die p53-Expression jeweils nicht. Es ist nach Behandlung mit Pifithrin-α ein deutlich erhöhter Gehalt an phosphoryliertem Akt erkennbar und die S6-Phosphorylierung wird negativ beeinflusst. In den Immunblot-Analysen mit COLO-699 Zellen kann MDM2 nicht eindeutig nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse

Die weitere Auswertung der Versuche mit COLO-699 Zellen zeigt (siehe Abb. 4-27C), dass die Pifithrin- α -Behandlung die p53-Expression im Vergleich zur DMSO-Behandlung nicht bedeutsam beeinflusst. Die Phosphorylierung von Akt und S6 werden durch die Behandlung mit diesem Inhibitor im Vergleich zur Kontrolle induziert. Die Immunblots von behandelten PANC-1 Zellen zeigen in diesen Analysen keinen adäquaten MDM2-Nachweis. Die auswertbaren Färbungen dokumentieren (repräsentativ in Abb. 4-27D), dass der p53-Gehalt nach der Nutlin-3-Behandlung in zwei von drei Versuchen unverändert vorliegt, in einem weiteren Versuch hingegen eine erhöhte p53-Menge vorliegt (nicht abgebildet). Die Pifithrin- α -Behandlung beeinflusst den p53-Gehalt im Vergleich zur DMSO-Behandlung nicht. Die Phosphorylierung von Akt und S6 liegt nach Pifithrin- α -Behandlung erhöht vor.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen (nicht abgebildet), welche mit Pifithrin- α behandelt wurden, zeigen bei COLO-699 und PANC-1 Zellen eine deutlich geringere Konfluenz, die Morphologie der Zellen ist unverändert. Weiterhin zeigt die mikroskopische Analyse Nutlin-3-behandelter Zellen keine veränderte Morphologie im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen, jedoch findet sich bei Nutlin-3-behandelten COLO-699 Zellen eine leicht geringere Konfluenz.

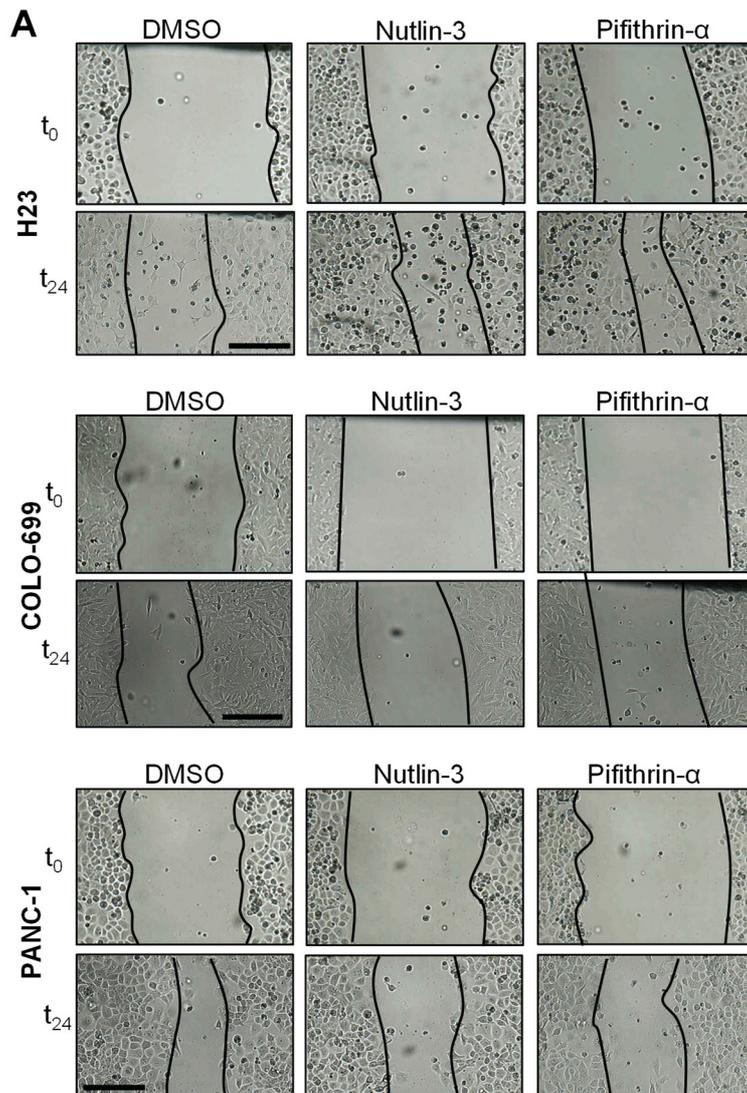
4.8.4 Einfluss von Nutlin-3 und Pifithrin- α auf die Migration

Zur Analyse des Einflusses von Pifithrin- α und Nutlin-3 auf die Migration wurden *Wounding-Assays*, wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben, mit PANC-1, COLO-699 und H23 Zellen mit Zusatz dieser Inhibitoren durchgeführt. Für H23 und PANC-1 Zellen wurde in den *Assays* die Konzentration 10 μ M Pifithrin- α statt der zuvor verwendeten Konzentration 25 μ M (siehe Kapitel 4.7.1) gewählt, da die Zellen 48 h nach Behandlung mit 25 μ M Pifithrin- α starke morphologische Veränderungen aufwiesen.

Die quantitative Auswertung der Versuche mit H23, COLO-699 und PANC-1 Zellen ist in Abb. 4-28B im Balkendiagramm als Mittelwert des relativen Wundverschlusses nach 24 h \pm SEM dargestellt. In den gezeigten Aufnahmen aus den *Wounding-Assays* in Abb. 4-28A ist dazu repräsentativ der Wundverschluss erkennbar. Die Auswertung der 24 h Werte von H23 Zellen zeigt eine deutlich erhöhte Migration der Pifithrin- α -behandelten H23 Zellen mit einem Wundverschluss von 67.6 ± 1.4 % (SEM; n = 3) im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen mit 49.5 ± 6.9 % (SEM; n = 3). Nutlin-3-behandelte Zellen verschließen den Spalt im gleichen Zeitraum zu 59.1 ± 7.4 % (SEM; n = 3). COLO-699 Zellen erreichen nach Nutlin-3-Behandlung mit einem Wundverschluss von 60.3 ± 9.2 % (SEM; n = 4) im Vergleich zur DMSO-Behandlung mit 54.1 ± 5.5 % (SEM; n = 4) einen vergleichbaren Wundverschluss. Die Behandlung der COLO-699 Zellen mit Pifithrin- α inhibiert den Wundverschluss auf 44.4 ± 4.7 % (SEM; n = 4) im Vergleich zur Kontrolle deutlich.

4. Ergebnisse

Die Auswertungen der Assays mit PANC-1 Zellen zeigen, dass die Nutlin-3-Behandlung den relativen Wundverschluss mit $58.4 \pm 4.5 \%$ (SEM; $n = 4$) im Vergleich zur Kontrolle mit $53.8 \pm 7.9 \%$ (SEM; $n = 5$) nicht maßgeblich verändert und die Behandlung mit Pifithrin- α zu einer schwachen Reduktion des Wundverschlussrate auf 49.1% ($n = 2$) führt. Die Aufnahmen der Spalten aus *Wounding-Assays* von H23 Zellen, welche am Zeitpunkt t_{48} angefertigt wurden, zeigen die Ablösung der mit Nutlin-3- oder Pifithrin- α -behandelten Zellen von der Plastikoberfläche ($n = 3$; nicht abgebildet). Eine Beurteilung der Spaltbreite war aufgrund dessen nicht möglich. Die weitere Auswertung der 48 h Werte aus *Wounding-Assays* von COLO-699 und PANC-1 Zellen ist Tabelle 10-7 im Anhang zu entnehmen.



4. Ergebnisse

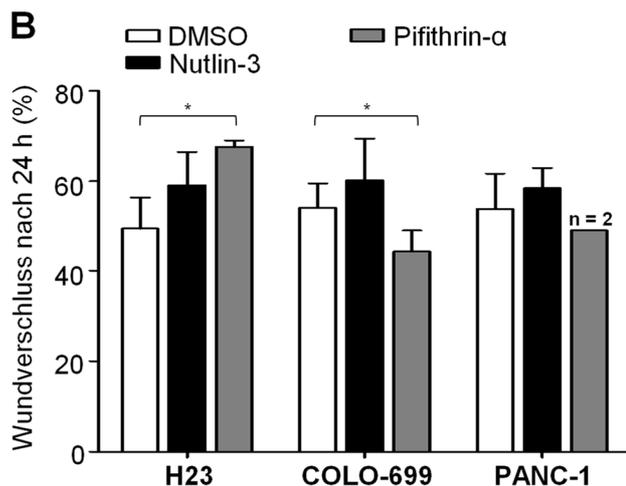


Abb. 4-28. Effekt von Nutlin-3 und Pifithrin- α auf die Zellmigration. Für *Wounding-Assays* wurde in konfluent gewachsene H23, COLO-699 und PANC-1-Zellen mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Die Zellen wurden in Medium mit 1 % FCS (PANC-1) oder 5 % FCS (H23, COLO-699) kultiviert und mit Nutlin-3 (10 μ M), Pifithrin- α (10 μ M; COLO-699: 25 μ M) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. Die Fotos und Messungen der Wunden wurden 2 h nach dem *Wounding* (t_0), 24 h (t_{24}) und 48 h (t_{48}) danach angefertigt. (A) Repräsentative Aufnahmen der Spalten aus *Wounding-Assays* zu den Zeitpunkten t_0 und t_{24} (Maßstabsbalken = 250 μ m). (B) Quantifizierung des relativen Wundverschlusses nach 24 h. Der relative Wundverschluss wurde anhand von Messungen der Spaltbreite zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert \pm SEM angegeben (H23 n = 3; COLO-699 n = 4; PANC-1 n \geq 2).

4.9 Einfluss von MEK1/2 auf die Zellmigration

Da die MEK1/2-Kinasen auch an der Kontrolle der Migration beteiligt sein könnten, sollte diese Möglichkeit in weiteren *Wounding-Assays* mit PANC-1, H23 und COLO-699 Zellen unter Einsatz der spezifischen MEK-Inhibitoren UO-126 (MEK1/2-Inhibitor) und PD98059 (MEK1-Inhibitor) untersucht werden.

4.9.1 Nachweis der Wirksamkeit der MEK-Inhibitoren

Die Wirksamkeit der MEK-Inhibitoren wurde vor Einsatz in *Wounding-Assays* anhand der ERK1/2-Phosphorylierung in exemplarischen Versuchen überprüft. Dazu wurden H23 Zellen in Zeitreihen über 48 h mit UO-126 oder PD98059 in DMEM ohne Zusätze behandelt. In einem Ansatz wurden die Inhibitoren nach 12 h erneut in das Medium gegeben („24 h, 2x“). Es wurde die ERK1/2-Phosphorylierung und die Akt-Phosphorylierung in RIPA-Zelllysaten im Immunblotverfahren analysiert. Die Immunblots zeigen (siehe Abb. 4-29A) in den Proben 12 h, 24 h und 48 h UO-126 (1 μ M und 10 μ M) im Vergleich zur Kontrolle (DMSO 12 h, 24 h, 48 h) einen deutlich geringeren Gehalt an phosphoryliertem ERK1/2. Im Ansatz mit erneuter Zugabe nach 12 h („24 h, 2x“) ist der Gehalt an phosphoryliertem ERK1/2-Phosphorylierung jeweils geringer als 24 h nach einmaliger Behandlung. Mit PD98059-Behandlung ist die Menge an

4. Ergebnisse

phospho-ERK1/2 in den Ansätzen 24 h und 24 h 2x im Vergleich zur Kontrolle am stärksten reduziert. Im Vergleich zur UO-126-Behandlung (10 μM , 24 h 2x) ist die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 nach PD98059-Behandlung deutlich höher. Die Akt-Phosphorylierung ist durch die Inhibitor-Behandlungen jeweils nicht beeinflusst. Die Zellen wurden 48 h nach Behandlung zur Kontrolle der Zellmorphologie mikroskopiert. Es zeigten sich nur mit der UO-126-Behandlung (10 μM) starke morphologische Veränderungen und die Zellen lösten sich teilweise von der Plastikoberfläche.

Die Versuche zur Wirksamkeit von UO-126 und PD98059 wurden ebenso mit COLO-699 Zellen durchgeführt und die Proben im gleichen Verfahren analysiert. In einem Ansatz wurde die Behandlung nach 24 h wiederholt („48 h 2x“). Die Immunblots zeigen (Abb. 4-29B), dass die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 in den Ansätzen 24 h, 48 h 2x und 48 h mit UO-126 (10 μM) vergleichend zur jeweiligen Kontrolle (DMSO für 24 h, 48 h 2x, 48 h) deutlich vermindert ist. Die UO-126-Behandlung (1 μM) resultiert im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle ausschließlich im Ansatz 48 h 2x in einer deutlich verringerten pERK1/2-Menge. Die PD98059-Behandlung resultiert vergleichend zur Kontrolle in den Ansätzen 24 h und 48 h in einem leicht verminderten phospho-ERK1/2-Gehalt. Die Akt-Phosphorylierung wird durch die Behandlungen jeweils nicht beeinflusst. Die Mikroskopie 48 h nach Behandlung zeigte keine morphologischen Veränderungen der Zellen.

4.9.2 Einfluss einer MEK/ERK-Inhibition auf die Zellmigration

Zur Ermittlung, ob MEK1/2 bzw. ERK1/2 in der Migration von PANC-1, COLO-699 und H23 Zellen eine Rolle spielen, wurden *Wounding-Assays*, wie in Abschnitt 4.7.1 beschrieben, durchgeführt und ausgewertet. Die Zellen wurden jeweils mit UO-126 oder PD98059 sowie zur Kontrolle mit DMSO inkubiert. Der relative Wundverschluss nach 24 h (48 h Werte siehe Tabelle 10-8 im Anhang) ist im Balkendiagramm in Abb. 4-27C als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Quantifizierung zeigt, dass der relative Wundverschluss von PANC-1 Zellen nach UO-126-Behandlung (1 μM ; 10 μM) mit 53.9 ± 2.9 % (SEM; n = 3), respektive 60.2 ± 3.1 % (SEM; n = 3) oder PD98059-Behandlung mit 60.0 ± 0.8 % (SEM; n = 3) im Vergleich zur Kontrolle mit 53.1 ± 5.6 % (SEM; n = 7) nicht wesentlich verändert ist. H23 Zellen migrieren unter Zusatz von UO-126 (1 μM) mit 54.1 ± 6.1 % (SEM; n = 3) im Vergleich zur DMSO-Behandlung mit 49.5 ± 6.9 % (SEM; n = 3) in etwa gleich weit. Mit UO-126 (10 μM) oder PD98059 ist die Wundverschlussrate mit 39.4 ± 2.1 % (SEM; n = 3) bzw. 40.0 ± 0.9 % (SEM; n = 3) im Vergleich zur Kontrolle leicht reduziert. Die Auswertung für COLO-699 Zellen zeigt, dass diese mit Zusatz von UO-126 (1 μM oder 10 μM) die Wunde mit 57.3 ± 15.2 % (SEM; n = 3), respektive 53.3 ± 9.1 % (SEM; n = 5) nicht bedeutsam schneller verschließen, als die DMSO-behandelten Zellen mit 48.5 ± 7.2 % (SEM; n = 7). Unter Zusatz von PD98059 ist dies mit einem

4. Ergebnisse

Wundverschluss von 46.5 ± 4.4 % (SEM; n = 3) ebenso zu beobachten. Somit zeigt die Verwendung von UO-126 oder PD98059 einzig bei H23 Zellen einen schwach inhibitorischen Effekt auf die Migration.

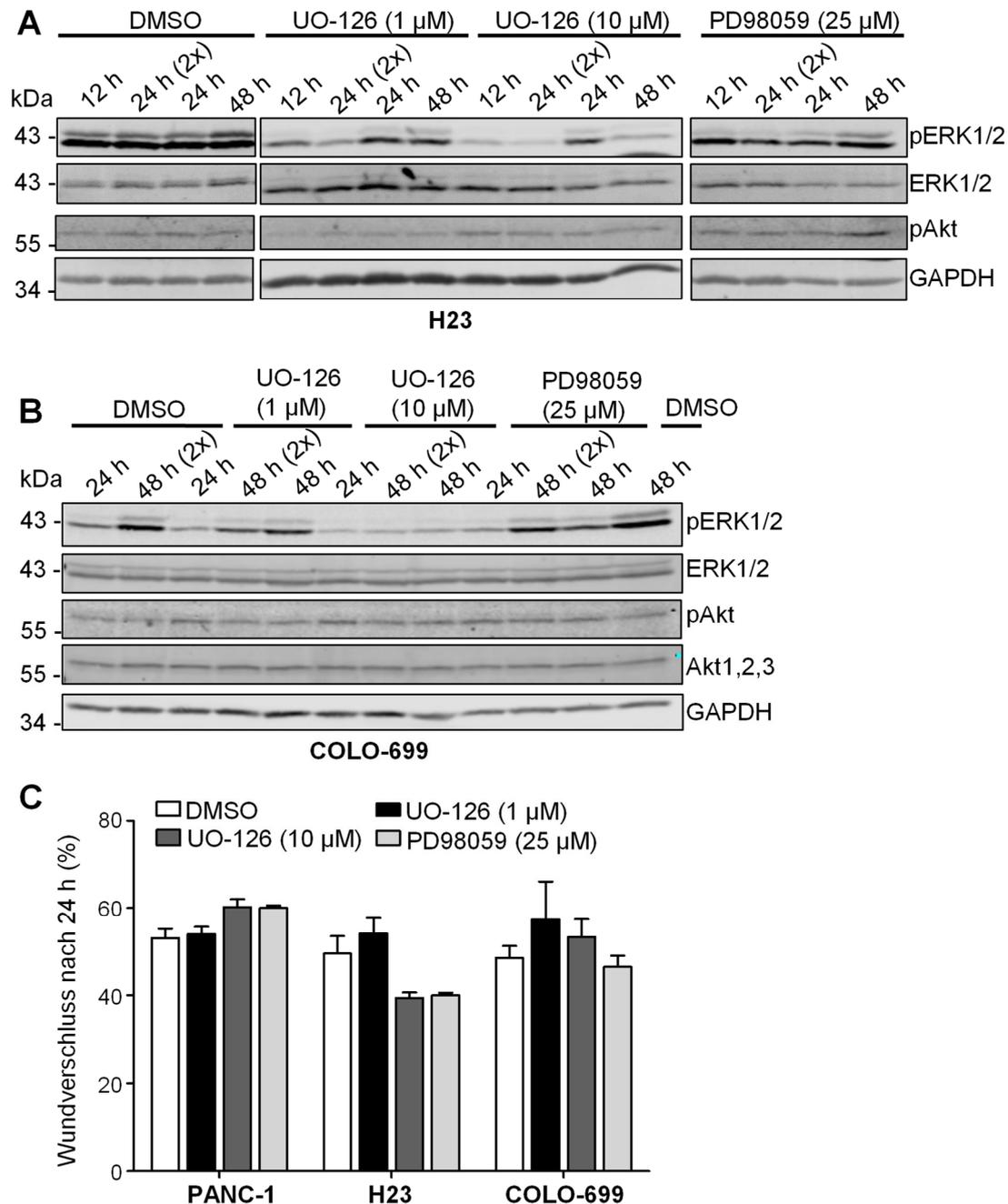


Abb. 4-29. Effekt von MEK-Inhibitoren auf die ERK1/2-Phosphorylierung und die Zellmigration. (A-B) Immunblot-Analysen nach MEK-Inhibition. Subkonfluent gewachsene H23 (A) und COLO-699 Zellen (B) wurden in DMEM ohne Zusätze kultiviert und mit UO-126 (1 μ M;10 μ M), PD98059 (25 μ M) oder DMSO (0.1 %) für die angegebenen Zeiträume behandelt (24 h 2x = erneute Zugabe des Inhibitors nach 12 h; 48 h 2x = erneute Zugabe des Inhibitors nach 24 h). In 50 μ g RIPA-Zelllysaten wurden die Expression und Phosphorylierung von ERK1/2- und Akt1,2,3 im Immunblotverfahren, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle ebenso nachgewiesen.

4. Ergebnisse

(C) Quantifizierung des relativen Wundverschlusses nach 24 h. Für *Wounding-Assays* wurde in konfluent gewachsene Zellen (PANC-1, H23 und COLO-699) mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Die Zellen wurden in Medium mit 1% (PANC-1) oder 5 % FCS (H23, COLO-699) kultiviert und mit UO-126 (1 μ M; 10 μ M), PD89059 (25 μ M) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. Die Fotos der Wunden (nicht dargestellt) wurden 2 h nach dem *Wounding* und 24 h danach angefertigt. Der relative Wundverschluss wurde anhand von Messungen der Spaltbreite zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n \geq 3$).

4.10 Effekte einer Akt-Aktivierung auf das Aktin-Zytoskelett

Die Akt-Kinase-Assays konnten eine SC-79-induzierte Akt3-Aktivierung in H23 und COLO-699 Zellen nachweisen (siehe Kapitel 4.5). Um den Effekt einer SC-79-induzierten Akt-Aktivierung auf das Aktin-Zytoskelett zu untersuchen, wurden Lebendzell-Aufnahmen nach Färbung mit dem Aktin-färbenden Molekül SiR-Actin angefertigt. PANC-1 Zellen und HCC-44 Zellen wurden zur Akt-Aktivierung in Medium ohne Zusätze mit SC-79 behandelt. HCC-44 Zellen wurden für diesen Versuch ausgewählt, da sie im Vergleich zu COLO-699, H23 oder PANC-1 Zellen ein größeres Zellsoma besitzen und sich hierdurch eine bessere Analysierbarkeit der Zellmorphologie und vor allem des Aktin-Zytosketts ergibt. Für diese Zelllinie konnte ebenso eine erhöhte SC-79-induzierte Akt-Phosphorylierung in Vorversuchen gezeigt werden (siehe Kapitel 4.4). Repräsentative Fluoreszenz-Aufnahmen von PANC-1 und HCC-44 Zellen sind in Abb. 4-30 dargestellt. PANC-1 Zellen zeigen nach 30 min SC-79-Behandlung die Ausbildung von Filopodien (Pfeile in Abb. 4-30 B, B-), welche vor der Behandlung nicht zu beobachten waren (Abb. 4-30A). SC-79-behandelte HCC-44 Zellen zeigen die Filopodienbildung bereits sehr deutlich nach 3 min und stark 30 min nach Behandlung (Pfeile in Abb. 4-30D-E), während unbehandelte Zellen (Abb. 4-30C) diese Filopodien nicht aufweisen.

Ferner lösen sich die Zellen innerhalb von 45 min nach SC-79-Behandlung fast vollständig voneinander. Außerdem verändert sich das Aktin-Zytoskelett der HCC-44 Zellen innerhalb des beobachteten Zeitraums. Die Aktin-Stressfasern, die vor der Behandlung gut in den Zellen in Abb. 4-30C zu erkennen sind, werden aufgelöst und ein diffuses Aktin-Netzwerk ist zu beobachten. Somit induziert SC-79 eine Reorganisation des Aktin-Zytosketts und die Ausbildung von Filopodien.

4. Ergebnisse

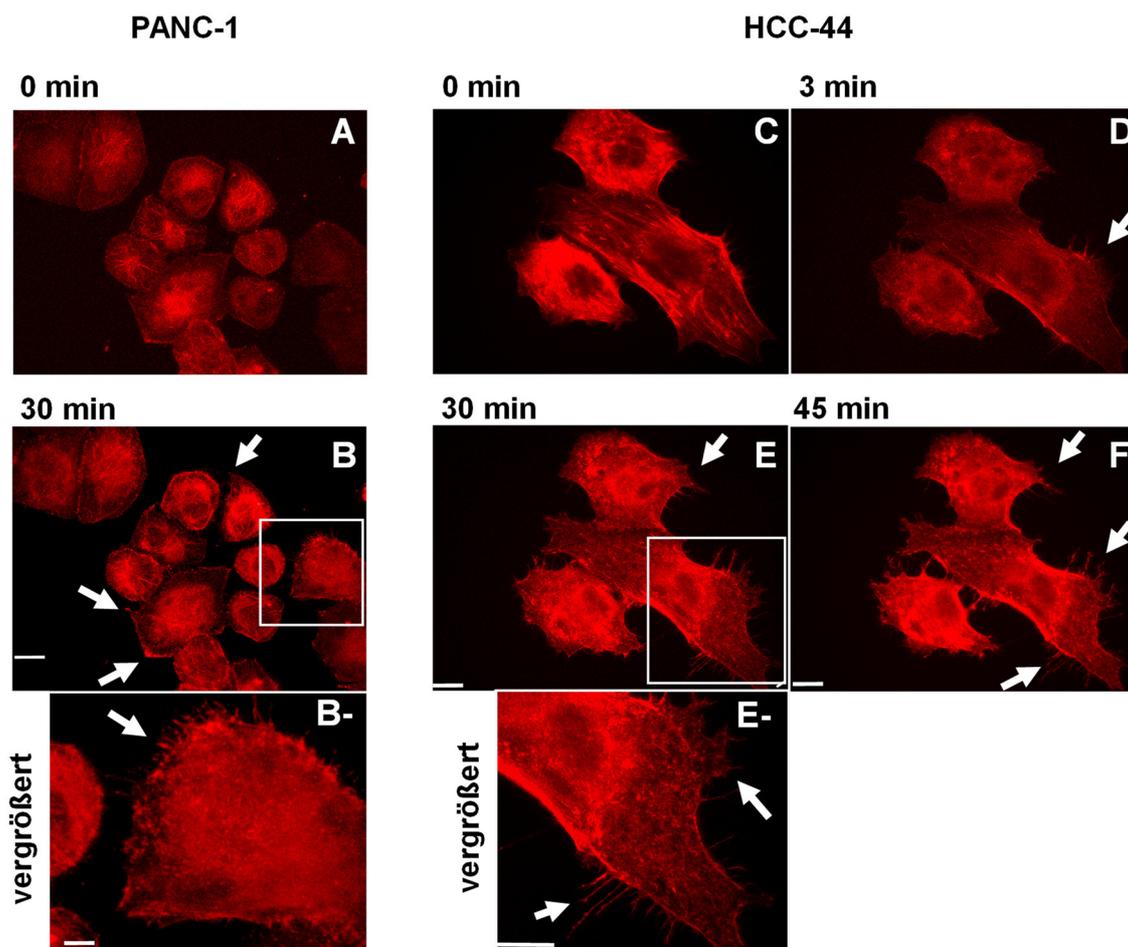


Abb. 4-30. Effekt von SC-79 auf das Aktin-Zytoskelett. Subkonfluent gewachsene PANC-1 (A - B) oder HCC-44 (C - F) Zellen wurden mit SiR-Actin Lösung ($1 \mu\text{M}$ für PANC-1; $2 \mu\text{M}$ für HCC-44) gefärbt und anschließend mit SC-79 ($10 \mu\text{M}$) behandelt. Die Fluoreszenz-Aufnahmen erfolgten bei einer Emission von 574 nm . (A - F) Fluoreszenz-Aufnahmen der Zeitpunkte vor der Behandlung (A, C) und 3 min (D), 30 min (B, E) sowie 45 min (F) nach SC-79-Behandlung. Maßstabsbalken = $20 \mu\text{m}$ (PANC-1 $n = 2$, HCC44 $n = 3$). (B-, E-) Vergrößerte Ausschnitte der eingerahmten Stellen. Maßstabsbalken = $5 \mu\text{m}$ (B-); $10 \mu\text{m}$ (E-)

Um im Folgenden die Auswirkungen von SC-79 auf das Aktin-Zytoskelett migrierender Zellen zu untersuchen, wurden konfluent gewachsene HCC-44 Zellen mit SiR-Actin-Lösung gefärbt und ein *Wounding-Assay* mit anschließender SC-79-Behandlung durchgeführt. Zur Kontrolle wurde der Versuch ebenso mit DMSO-behandelten Zellen durchgeführt. Ein Spalt wurde über einen Zeitraum von 240 min beobachtet, indem alle 30 min Fluoreszenz-Aufnahmen, wie zuvor beschrieben, aufgenommen wurden. Repräsentative Fluoreszenz-Aufnahmen der Zellen direkt nach dem *Wounding* sowie 120 min und 240 min nach Behandlung sind in Abb. 4-31 gezeigt. In den Aufnahmen ist zu erkennen, dass SC-79-behandelte Zellen im Verlauf von 120 min kleiner und rundlicher werden und sich vom Zellverband lösen (D-F). Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, verbleiben im Verlauf der Aufnahme im Zellverband und verändern ihre Morphologie nicht (A-C).

4. Ergebnisse

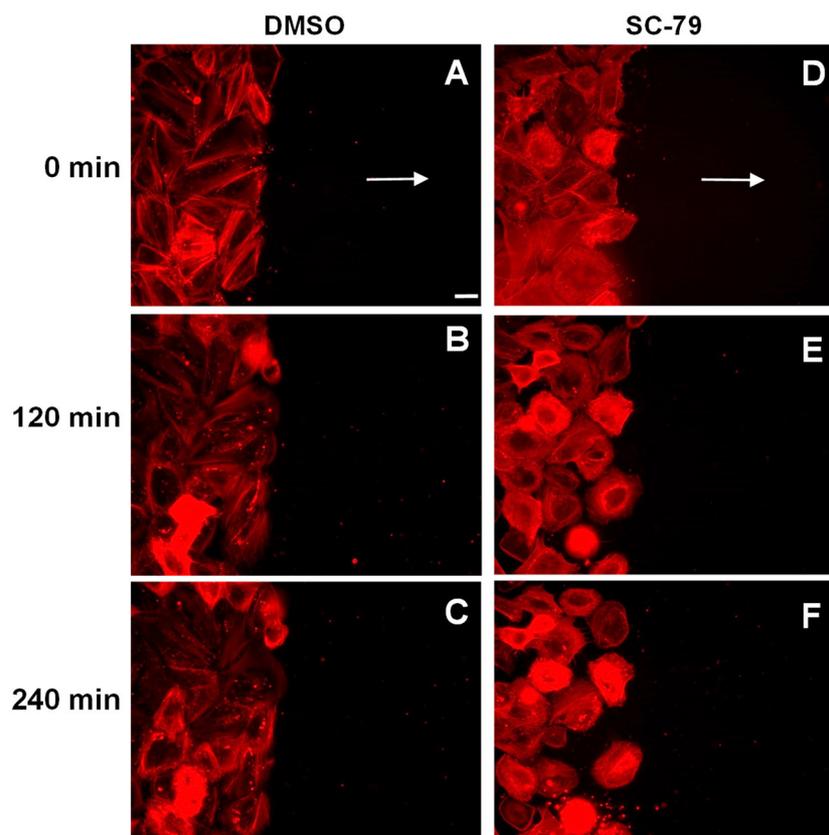


Abb. 4-31. Effekt von SC-79 auf das Aktin-Zytoskelett im Prozess der Migration. Konfluent gewachsene HCC-44 Zellen wurden mit SiR-Actin Lösung (2 μM) gefärbt, mit einer Pipettenspitze eine Wunde zugefügt und die Zellen anschließend mit SC-79 (10 μM) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. Die Aufnahmen wurden direkt (0 min), 120 min und 240 min nach dem *Wounding* bei 574 nm aufgenommen. Die Pfeile zeigen die Migrationsrichtung; Maßstabsbalken = 20 μm (n = 3).

Zur weiteren Analyse des Einflusses einer SC-79-vermittelten Akt-Aktivierung auf das Zytoskelett wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, in denen F-Aktin, α -Tubulin und der Zellkern angefärbt wurden (beschrieben in Kapitel 3.1.9). Für die Analysen wurden konfluent gewachsene HCC-44 Zellen nach *Wounding* mit SC-79 behandelt und 30 min sowie 60 min nach der Behandlung fixiert. DMSO-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 4-32 dargestellt. In den Fluoreszenz-Aufnahmen direkt nach dem *Wounding* (A-C) ist zu erkennen, dass das Aktin-Netzwerk vor allen Dingen aus kortikalem Aktin besteht. Die Mikrotubuli liegen im gesamten Zytoplasma verteilt vor und sind sehr prominent um den Zellkern angeordnet. 30 min und 60 min nach *Wounding* ist in Zellen, die mit DMSO behandelt wurden (D; F) weiterhin ein Aktin-Netzwerk aus kortikalem Aktin zu erkennen. Einzelne Zellen zeigen Aktin-Stressfasern. Die Zellen verbleiben innerhalb von 60 min weiterhin im Zellverband (D-I). Die Ausbildung von Lamellipodien ist in einem Teil der Zellen direkt am Spalt in dem vergrößerten Ausschnitt erkennbar (I-). Somit beginnen die

4. Ergebnisse

Zellen am Spaltrand mit der Migration. Es ist anhand der Gelb-Färbung der überlagerten Aufnahme (F; I) zu schlussfolgern, dass α -Tubulin und F-Aktin in den Lamellipodien ko-lokalisiert vorliegen. Die SC-79-Behandlung führt innerhalb von 30 min dazu, dass die Zellen nun ein diffuses Aktin-Netzwerk aufweisen und im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen einen lockereren Zellverband ausbilden (J-L). Die SC-79-behandelten Zellen am Spaltrand lösen sich sehr deutlich vom Zellverband ab und zeigen in Richtung des restlichen Zellverbands die massive Ausbildung von Filopodien, was die vergrößerte Aufnahme (L-) zeigt. In Richtung des Spaltes bilden die Zellen Lamellipodien aus, die aus F-Aktin und α -Tubulin bestehen (L-). Wiederum ist eine Ko-Lokalisation von F-Aktin und α -Tubulin in der Führungslamelle anhand der Gelbfärbung in der vergrößerten Aufnahme zu erkennen (L-). Nach 60 min ist die Loslösung der Zellen vom Zellverband und die Ausbildung der Lamellipodien, die aus F-Aktin und α -Tubulin bestehen, in abgeschwächter Ausprägung erkennbar (M-O; O-).

Somit wird durch SC-79 die Migration von HCC-44 Zellen induziert. Die Zellen zeigen eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, die Ausbildung einer Führungslamelle und das Loslösen vom Zellverband. Zusätzlich kann eine Ko-Lokalisation von α -Tubulin und F-Aktin in der Führungslamelle nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse

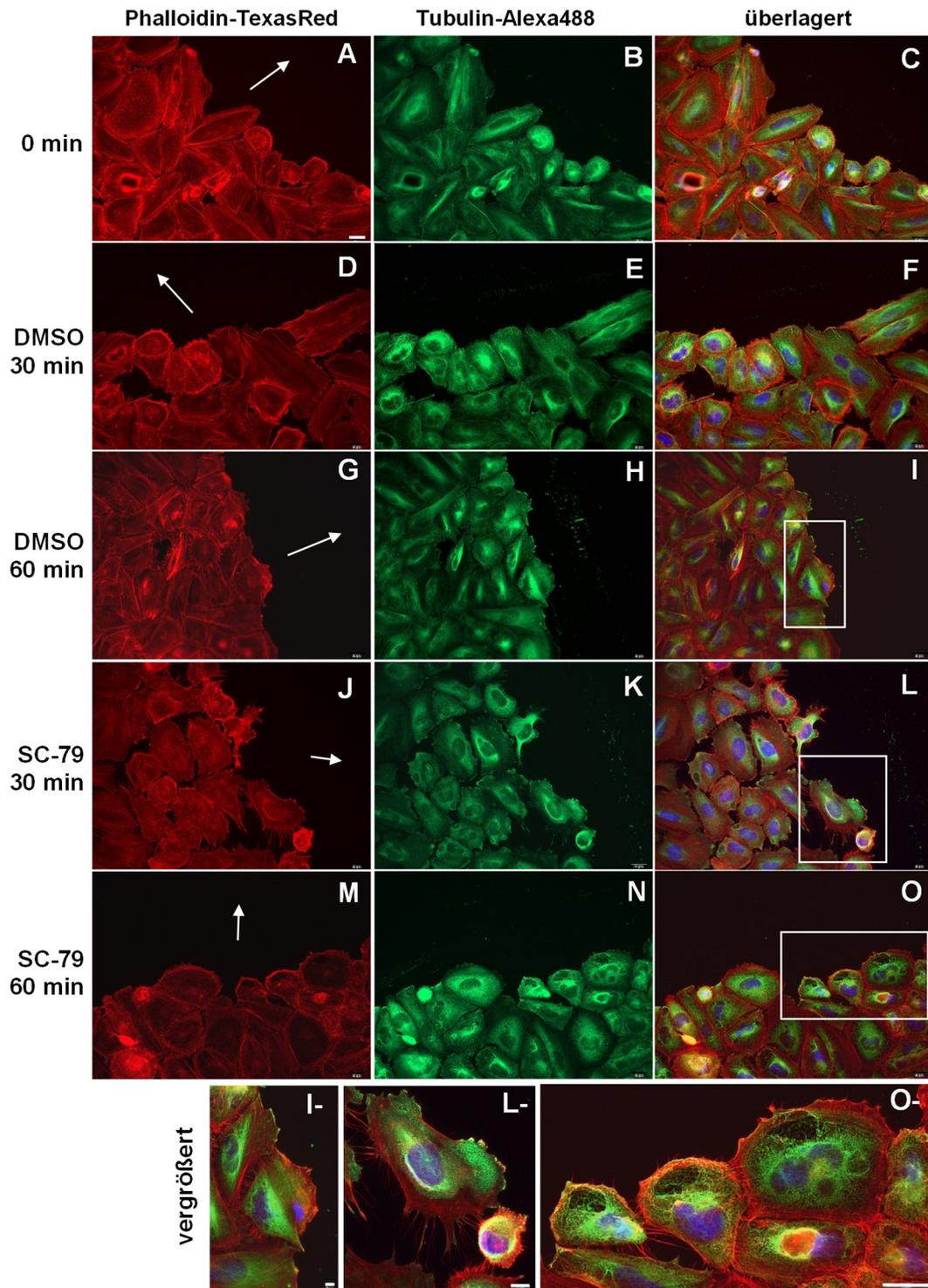


Abb. 4-32. Effekt von SC-79 auf das Aktin- und Tubulin-Zytoskelett im Prozess der Migration. Konfluent gewachsene HCC-44 Zellen wurden nach *Wounding* entweder direkt (0 min) sowie nach Behandlung mit SC-79 (10 μ M) oder DMSO (0.1 %) zu den angegebenen Zeitpunkten mit Paraformaldehyd fixiert. Die Färbung von F-Aktin erfolgte mit Phalloidin-Texas-Red, des Zellkerns mit DAPI und die der Mikrotubuli mit einem spezifischen Antikörper gegen α -Tubulin, detektiert mit Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpern. (A-O) Dargestellt ist jeweils ein repräsentative Fluoreszenz-Aufnahme der F-Aktin-Färbung (Emission 574 nm; links), der Tubulin-Färbung (Emission 507 nm; Mitte) und die überlagerte Aufnahme mit DAPI-Färbung (Emission 461 nm; rechts). Die Pfeile zeigen die Migrationsrichtung. Maßstabsbalken = 20 μ m. (I-, L-, O-) Vergrößerte Ausschnitte der eingerahmten Stellen. Maßstabsbalken = 5 μ m (I-), = 10 μ m (L-), = 20 μ m (O-).

4.11 Identifizierung und Verifizierung putativer Akt3-Substrate

4.11.1 Identifizierung putativer Akt3-Substrate

In H23 Zellen konnte nach Behandlung mit SC-79 oder EGF eine deutliche Akt3-Kinase-Aktivität nachgewiesen werden, was auf eine spezifische Funktion von Akt3 hindeutet. Um zu analysieren, welche Substrate von Akt3 phosphoryliert werden, wurde eine phospho-Akt-Substrat-spezifische Proteom-Analyse unter Verwendung des *post-translationally modified* (PTM) *Scan Discovery Services*[®] von Cell Signaling Technology[™], wie in Kapitel 3.2.11. beschrieben, durchgeführt. H23 Zellen wurden für die Analyse wie folgt behandelt: Als Kontrolle diente eine Behandlung mit DMSO und die Induktion der Akt-Aktivität erfolgte mit SC-79. Um Akt3-spezifische Effektoren zu untersuchen, wurden die Zellen mit siAkt3 transfiziert und ebenso mit SC-79 behandelt. Die Lyse der Proben erfolgte nach Anleitung von Cell Signaling Technology[™] in Urea-Lyse-Puffer (siehe dazu Kapitel 3.2.11.).

Die von CST im Rahmen des *PTM Scan Discovery Services*[®] durchgeführten Auswertung der Phospho-Proteom-Analyse (siehe Kapitel 3.2.11) zeigte eine Gesamtanzahl von 6434 redundant modifizierten Phosphopeptiden in den analysierten Proben. Die Messungen erfolgten jeweils in Doppelwerten und wiesen mit einem medianen Variationskoeffizienten von 11 % (DMSO), 8 % (SC-79) und 7% (siAkt3 + SC-79) zwischen den analytischen Replikaten eine hohe Messgenauigkeit auf. Die von CST bereitgestellte Auswertung enthielt zum Vergleich der Effekte der Behandlungen auf die identifizierten Phosphopeptide die relativen, x-fachen Veränderungen der Phosphopeptide zwischen den Proben, die als Basis zur weiteren Datenanalyse genutzt wurde. Die x-fachen Veränderungen wurden durch Bildung des Verhältnisses der integrierten *Peak*-Fläche der korrespondierenden, zugeordneten Peptide zwischen den Ansätzen SC-79 vs. DMSO, siAkt3 + SC-79 vs. DMSO und siAkt3 + SC-79 vs. SC-79 ermittelt. In der folgenden Datenanalyse wurden nur Phosphopeptide mit einer mindestens 2.2-fachen Veränderung als verändert bewertet. Diese Analyse zeigte, dass insgesamt 2949 modifizierte Phosphopeptide im Vergleich der Proben SC-79 vs. DMSO, siAkt3 + SC-79 vs. DMSO oder siAkt3 + SC-79 vs. SC-79 verändert vorliegen. Um putative Akt-Substrate weiter einzugrenzen, wurden anschließend nur solche Phosphopeptide herausgefiltert, deren Messabweichung weniger als 50 % in den Doppelwerten betrug. Diese Auswertung zeigt mehr als 700 veränderte Phosphopeptide. In der *Heatmap* (erstellt in GProX) in Abb. 4-33A sind die x-fachen Veränderungen dieser Phosphopeptide illustriert. Es ist in dieser *Heatmap* zu erkennen, dass im Verhältnis der Proben SC-79 vs. DMSO eine Vielzahl hyperphosphorylierter Peptide (grün; > +25-fach verändert) vorhanden sind. Somit zeigt die SC-79-Behandlung positive Effekte auf das Phospho-Akt-Substrat-Proteom.

4. Ergebnisse

Das Verhältnis siAkt3 + SC-79 vs. DMSO zeigt vergleichend dazu eine geringere Anzahl und Ausprägung an hyperphosphorylierten Peptiden. Daran ist erkennbar, dass die siAkt3 + SC-79-Behandlung im Vergleich zur SC-79-Behandlung einen geringeren Einfluss auf die Phosphorylierung von putativen Akt-Substraten nimmt. Der Vergleich der Proben siAkt3 + SC-79 zu SC-79 zeigt eine hohe Anzahl an Phosphopeptide, die Veränderungen im Bereich von +25-fach bis -25-fach (schwarz) aufweisen. Somit wirkt sich die SC-79-Behandlung siAkt3-behandelter Zellen geringfügiger auf das Phospho-Akt-Substrat-Proteom aus, als die alleinige SC-79-Behandlung. Eine detaillierte Analyse der identifizierten putativen Akt-Substrate erfolgt im Kapitel 4.11.3.

4.11.2 Kontrolle der Behandlung und Verifizierung putativer Akt3-Substrate

Zur Kontrolle wurde in den Lysaten des Phospho-Akt-Proteom-Scans die Akt-Phosphorylierung an den Stellen S473 und T308 und die Akt3-Expression im Immunblotverfahren analysiert. Der Immunblot in Abb. 4-32B zeigt, dass ein höherer Gehalt an phosphorylierten Akt an S473 sowie an T308 nach SC-79-Behandlung detektierbar ist, während die Behandlung mit siAkt3 + SC-79 den phospho-Akt-Gehalt (S473 und T308) im Vergleich zur DMSO-Behandlung nicht beeinflusst. Der Akt3-Nachweis zeigt einen geringen Akt3-Gehalt in der siAkt3 + SC-79-Probe.

Mithilfe eines Akt-Kinase-Assays wurde anschließend überprüft, wie sich die Behandlungen auf die Kinaseaktivität der Akt-Isoformen auswirken. Dazu wurde die Aktivität von Akt1, Akt2 und Akt3 in parallel mit den Lysaten für den Proteom-Scan angefertigten NP-40-Lysaten analysiert. Die Analyse erfolgte wie in Kapitel 4.5 beschrieben. Die Auswertung der Immunblots zeigt Folgendes (nicht abgebildet): Der Nachweis des immunpräzipitierten Akt1-3 im Immunblot dokumentiert, dass Akt1 und Akt2 in gleichen Mengen aus den drei Proben präzipitiert werden, während Akt3 in der gleichen Menge nur aus der DMSO- und SC-79-Probe präzipitiert werden kann. Aus der siAkt3 + SC-79-Probe wird eine sehr geringe Akt3-Menge präzipitiert. Ausschließlich in der SC-79-behandelten Probe ist im Vergleich zur DMSO-Probe eine deutliche Akt3-Aktivität detektierbar. Somit kann geschlossen werden, dass Akt3 durch SC-79 aktiviert wurde. Die Behandlung mit siAkt3 minimiert die Akt3-Expression. Die erfolgte Akt3-Depletion in der siAkt3 + SC 79-Probe ermöglicht somit eine Ermittlung von Akt3-spezifischen Effekten.

4. Ergebnisse

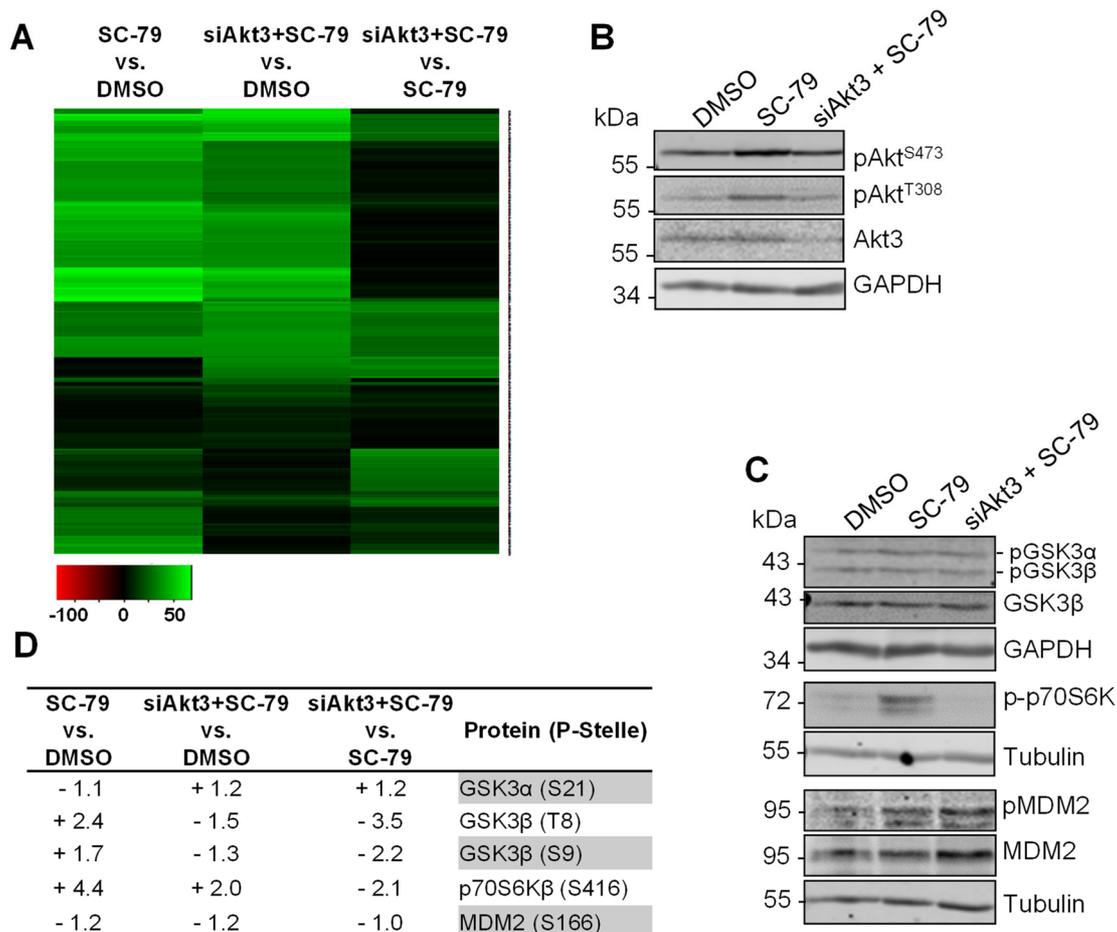


Abb. 4-33. Phospho-Akt-Substrat Proteom-Analyse mithilfe des *PTM-Scan Discovery Service*[®] von Cell Signaling Technology[™]. Subkonfluent gewachsene H23 Zellen wurden über Nacht in DMEM ohne Zusätze kultiviert und anschließend 30 min mit SC-79 (10 µM) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. In einem weiteren Ansatz wurden H23 Zellen mit 100 nM siAkt3 transfiziert und für 72 h inkubiert. Die Zellen wurden über Nacht in DMEM ohne Zusätze kultiviert und danach 30 min mit SC-79 (10 µM) behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte in Urea-Lyse-Puffer. Die Proben wurden durch den *PTM-Scan Discovery Service*[®] von Cell Signaling Technology[™] analysiert. Dazu wurden phospho-Akt Substrate mit zwei Antikörpern, die das phospho-Akt-Substrat-Motiv (RXRXXS*/T* or RXXS*/T*) erkennen, immunpräzipitiert. Die Proben wurden im Duplikat im LC-MS/MS analysiert. (A) *Heatmap* (erstellt mit GProX) von mehr als 700 verändert phosphorylierten Peptiden, die in der Phospho-Akt-Substrat Proteom-Analyse identifiziert wurden. Dargestellt sind die relativen, x-fachen Veränderungen zwischen den verschiedenen Konditionen: grün = hyperphosphoryliert, > +25-fach verändert; schwarz = Veränderungen zwischen -25 bis +25-fach; rot = hypophosphoryliert, > -25-fach verändert. Die x-fache Veränderung stellt das Verhältnis zwischen der integrierten *Peak*-Fläche der Probe und der jeweiligen Kontrollkondition dar. (B,C) Immunblot-Analysen der H23 Urea-Zelllysate (50 µg/Spur). Die Analyse erfolgte wie in Kapitel 4.4 beschrieben. Als Ladekontrolle dienten der Nachweis von GAPDH oder α-Tubulin. (D) Auswahl von im Phospho-Akt-Substrat Proteom-Scan identifizierten Phosphopeptiden und die relative, x-fache Veränderung zwischen den verschiedenen Konditionen. Das zum Phosphopeptid zugeordnete Protein und die Phosphorylierungsstelle (P-Stelle) sind rechts angegeben.

4. Ergebnisse

Um die Ergebnisse des Phospho-Akt-Substrat Proteom-Scans zu verifizieren, wurde die Phosphorylierung ausgewählter Akt-Effektoren im Immunblotverfahren analysiert und anschließend mit den Ergebnissen des Phospho-Akt-Substrat Proteom-Scans für diese Proteine (siehe Tabelle in Abb. 4-33C) verglichen. Die Immunblot-Analyse zeigt, dass die GSK3 α (S21)- und GSK3 β (S9)-Phosphorylierung in den drei Proben unverändert vorliegt. Dies bestätigt die Ergebnisse der Proteom-Analyse für das GSK3 α -Peptid, da Veränderungen von +/-1 im Vergleich der verschiedenen Proben gemessen wurden. Für das GSK3 β -Phosphopeptid(S9) bestätigt die Immunblot-Analyse den Proteom-Scan nicht, da im Proteom-Scan eine Veränderung von -2.2 im Vergleich der Proben siAkt3+SC-79-Probe zur SC-79-Probe detektiert wurde. Weiterhin zeigt der Immunblot für die p70S6K eine Induktion der Phosphorylierung an T384 in der SC-79-Probe. Im Proteom-Scan zeigte sich eine 4.4-fache Veränderung im Vergleich der Proben SC-79 zu DMSO. Die Immunblot-Analysen weisen für die MDM2-Phosphorylierung – bezogen auf die MDM2-Expression – keine veränderte Phosphorylierung in den drei Proben nach. Dies bestätigt wiederum die Ergebnisse der Proteom-Analyse, welche maximale Veränderungen von +/- 1.2 zwischen den Proben zeigten. Somit lassen sich die Ergebnisse der Proteom-Analyse für die hier analysierten Proteine in der Immunblot-Analyse teilweise reproduzieren.

4.11.3 Auswahl putativer Akt3-Substrate

Um im Folgenden mögliche Kandidaten als Akt3-spezifische Substrate zu priorisieren, wurden verschiedene Kriterien zur Auswahl der Kandidaten verwendet, die von Cell Signaling Technology™ zur Verfügung gestellt wurden. Um als Akt3-spezifisches Substrat eingestuft zu werden, sollte diese x-fache Veränderung nicht im Vergleich der Proben siAkt3 + SC-79 vs. SC 79 nachweisbar sein. Weiterhin sollte die maximale Intensität der Messung mindestens bei einem Wert von 500.000 liegen, um eine hohe Verlässlichkeit der Messung zu gewährleisten. Es wurde geprüft, ob die identifizierten Peptide während der Messung mehrfach identifiziert werden konnten, da so die Wahrscheinlichkeit für eine valide Identifikation höher ist. Ein weiteres Kriterium war, ob das Phosphopeptid an mehreren Stellen phosphoryliert wurde und ob sich die Veränderung der Phosphorylierung gleich verhielt. Falls die Veränderungen nicht gleich wären, so könnte dies auf eine komplexe Regulation des Proteins hindeuten, aber auch eine Fehlidentifikation sein.

Anhand der oben genannten Kriterien wurden die identifizierten Phosphopeptide evaluiert und mögliche Kandidaten, die als Akt3-Substrate in Frage kommen, herausgefiltert. Um auf die Funktion von Akt3 zurückschließen zu können, wurde jeweils die Funktion des zu dem Phosphopeptid zugeordneten Proteins mittels Datenbank-Recherche (PhosphoSitePlus® [118]) evaluiert. In Abb. 4-34 ist gezeigt, welche Funktion die Proteine der jeweils

4. Ergebnisse

zugeordneten Phosphopeptide besitzen. Es konnten Proteine mit sehr unterschiedlichen Funktionen, wie z. B. in der Transkriptionsregulation oder der RNA-Prozessierung, im Proteom-Scan als verändert phosphoryliert identifiziert werden. Vor allen Dingen werden aber mit 13 % solche Proteine verändert phosphoryliert, die mit der Regulation des Aktin-Zytoskeletts in Verbindung stehen (Aktin-Bindung; Adapter-/Gerüstproteine und Proteine zur Zelladhäsion). Deswegen wurden diese Phosphopeptide mit den zuvor genannten Kriterien nochmals überprüft. Es konnten dadurch insgesamt 14 Proteine als mögliche Akt-Effektoren erkannt werden, die in Tabelle 4-3 aufgeführt sind.

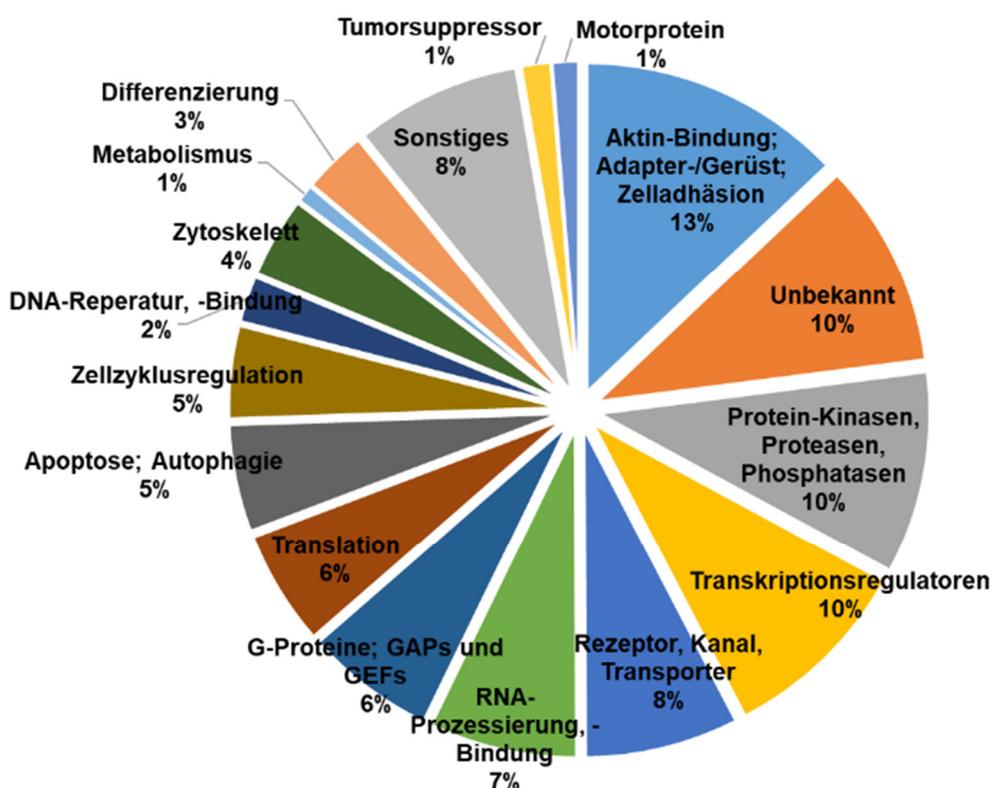


Abb. 4-34. Die Funktion der identifizierten putativen Akt-Substrate. Im Phospho-Akt-Substrat Proteom-Scan identifizierte, modifizierte Phosphopeptide, welche eine mindestens 2,2-fache Veränderung im Vergleich der Proben SC-79 zu DMSO, siAkt3+SC-79 zu DMSO oder SC-79 zu siAkt3+SC-79 in der Phosphorylierung aufwiesen, wurden anhand deren Aminosäure-Sequenz einem Protein zugeteilt. Die Proteine wurden mithilfe einer Recherche in der PhosphoSitePlus®-Datenbank einer Funktion zugeordnet.

Insgesamt weisen drei der 14 Phosphopeptide im Vergleich der Proben SC-79 zu DMSO eine hohe Hyperphosphorylierung auf: Die Phosphopeptide der Rho-assoziierten-Kinase-1 (ROCK1) mit Stelle S1333/1336 (+51.5) sowie des Adapter-/Gerüstproteins *Nance-Horan syndrome protein* (NHS) mit Stelle Y1193 (+23.5) und des kontraktilen Proteins Myosin 1E (MYO1E) mit Stelle T1002/S1005 (+57.8). Die Phosphopeptide von ROCK1 und MYO1E zeigen eine starke Hyperphosphorylierung mit +39.3, respektive +28.8 auch im Vergleich der Proben

4. Ergebnisse

siAkt3 + SC-79 zu DMSO. Dies spricht dafür, dass Akt3 diese Proteine nicht ausschließlich phosphoryliert. Für das Phosphopeptid aus dem Protein NHS ist im Vergleich der Proben siAkt3 + SC-79 zu SC-79 eine Hypophosphorylierung an Y1193 (-35.5) gemessen. Aufgrund dessen kann vermutet werden, dass Akt3 das Protein NHS an Y1193 phosphoryliert. Weitere mögliche Akt3-Effektoren sind das Protein Paxillin (Isoform 3) und Synaptopodin. Das identifizierte Phosphopeptid von Paxillin mit Stelle S313/316 weist eine positive Veränderung von +3.2 im Vergleich der Proben SC-79 zu DMSO auf und eine verminderte Phosphorylierung von -3.7 im Vergleich der Proben siAkt3 + SC-79 zu SC-79. Dieses Phosphorylierungsmuster der identifizierten Phosphopeptide ist ebenso für Synaptopodin (S804) und Caldesmon (T546) im Vergleich der verschiedenen Proben erkennbar.

Tabelle 4-3: Kandidaten, die im Phospho-Akt-Substrat Proteom-Scan identifiziert wurden und als Akt3-spezifisches Substrat in Frage kommen. Dargestellt sind die x-fache Veränderung der identifizierten Phosphopeptide relativ zur Kontrollkondition, die Phosphorylierungsstelle (= P-Stelle) der zugeordneten Proteine und deren Funktion (ermittelt in PhosphoSitePlus®). Die Kriterien zur Auswahl als putativ Akt3-spezifisches Substrat sind im Kapitel 4.1.1.3 aufgeführt.

SC-79: DMSO	siAkt3 + SC-79: DMSO	siAkt3 + SC-79: SC-79	Protein (P-Stelle)	Funktion
+3.3	+2.3	-1.4	Caldesmon (T546)	Aktin-Bindung
+2.6	+1.4	-1.8	Ankyrin-2 (S3903)	Adapter-/Gerüstprotein
+5.2	+2.4	-2.2	Ahnak (S210/S212)	Adapter-/Gerüstprotein
+3.2	+1.6	-2.0	IRS-1 (T309)	Adapter-/Gerüstprotein
+2.5	-1.5	-3.7	Paxillin Isoform 3 (S313/316)	Adapter-/Gerüstprotein
+51.1	+39.3	-1.3	ROCK1 (S1333/1336)	Regulation Aktin-Zytoskelett, Zellpolarität
-2.5	-2.0	+1.3	DOCK4 (S1724)	Rap1 -GEF; Regulation von <i>adherens junctions</i>
-2.2	-1.1	+2.0	DOCK5 (S1803)	Rac/Rho-GEF
+23.5	-1.5	-35.5	NHS (Y1193)	Zelladhäsionsregulation
+2.3	+1.2	-1.9	Desmoplakin (S165/166)	Zelladhäsions-/Zytoskelettprotein
+2.6	-2.1	-5.3	Synaptopodin (S804)	Aktin-Bindung Zytoskelettprotein
+2.4	+1.6	-1.1	DOCK7 (S963/964)	Fokale Adhäsion; Rac-GAP
-2.7	-2.0	+1.4	ANKRD2 (S99)	Kontraktilen Protein
+57.8	+28.8	-2.0	MYO1E (T1002/S1005)	Kontraktilen Protein

5. Diskussion

5.1 Einfluss von EGFP-K-Ras(V12) auf die Expression und Aktivität der Akt-Isoformen

5.1.1 Einfluss von EGFP-K-Ras(V12) auf die Expression der Akt-Isoformen

Das Proto-Onkogen K-Ras liegt in über 90 % der PDACs und in 33 % der Lungenadenokarzinome mutiert vor [21]. Die aus der K-Ras-Mutation resultierende, konstitutive K-Ras-Aktivität aktiviert verschiedenste Signalwege, darunter den MEK-ERK-Signalweg sowie PI3-K/Akt-abhängige Signalwege [19], welche Prozesse wie das Überleben, die Proliferation und die Motilität regulieren. In früheren Studien der Arbeitsgruppe wurde in PANC-1 Zellen, in denen konstitutiv aktives EGFP-K-Ras(V12) überexprimiert wurde, die Ausbildung eines motilen und invasiven Phänotyps beobachtet [25]. In den Analysen der vorliegenden Arbeit konnten die morphologischen Veränderungen dieser Zellen anhand des fibroblasten-artigen Phänotyps und der verstärkten Ausbildung von Zellausläufern dokumentiert werden. Transkriptomanalysen von Fensterer *et al.* bestätigten diesen invasiven Phänotyp, da eine reduzierte Expression epithelialer Marker, wie *CDLN4* (Claudin-4), *KRT8* oder *KRT19* (Keratin-8 bzw. -19) und die Induktion mesenchymaler Marker wie *CDH2* (N-Cadherin) im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Kontrollzellen gezeigt wurde [24]. Weiterhin wurde in den PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Zellklonen eine Aktivierung des p38- und des PI3-K/Akt-Signalweges nachgewiesen [32]. Die Akt-Aktivierung durch EGFP-K-Ras(V12) konnte in den PANC-1-Zellklonen in den eigenen Phosphorylierungsstudien bestätigt werden. Die eigenen Analysen der Expression der einzelnen Akt-Isoformen zeigten erstmals einen deutlich erhöhten Akt3- und verminderten Akt1-Gehalt in diesen Zellen. Da diese Effekte nicht bei stabiler Expression des dominant negativen EGFP-K-Ras(N17) auftraten, weist dies einen EGFP-K-Ras(V12)-spezifischen Effekt nach. Nicht ausgeschlossen werden kann aber, dass andere onkogene K-Ras-, H-Ras- oder N-Ras-Mutationen oder die Überexpression des jeweiligen Wildtyps die Expression der einzelnen Akt-Isoformen beeinflusst. Dies gilt es in weiterführenden Studien zu untersuchen. Die in dieser Arbeit vorgestellte, veränderte Akt1- und Akt3-Proteinexpression ist auf einen Effekt des überexprimierten EGFP-K-Ras(V12) auf die Genexpression von *AKT1* und *AKT3* oder einen Einfluss auf die mRNA-Stabilität zurückzuführen, da die mRNA-Analysen die verminderte Expression von *AKT1* und erhöhte Expression von *AKT3* zeigten. In den mRNA-Analysen konnte auch eine verminderte *AKT2*-Expression in den EGFP-K-Ras(V12)-Zellklonen nachgewiesen werden. Dieser Unterschied war auf Proteinebene vermutlich wegen der vorliegenden starken Akt2-Überexpression lediglich zu erahnen. *AKT2* konnte in früheren Studien der Arbeitsgruppe [24] bereits als durch

5. Diskussion

EGFP-K-Ras(V12)-induziert herunterreguliert identifiziert werden, was die aktuellen Ergebnisse untermauert. Wie EGFP-K-Ras(V12) die Expression der Akt-Isoformen allerdings reguliert, ist noch zu erforschen. Für den Rho-GEF *ARGHEF2* konnte aber bereits gezeigt werden, dass onkogenes K-Ras dessen Expression über eine MEK-ERK-abhängige Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren initiiert [119]. Da der MEK-ERK-Signalweg in PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Zellklonen nicht konstitutiv aktiv vorliegt [32], kommen aufgrund der früheren Studien [25,32] und der aktuellen Ergebnisse, z. B. der p38-Signalweg sowie PI3-K/Akt-abhängige Signalwege für die Vermittlung der EGFP-K-Ras(V12)-induzierten Effekte auf die *AKT1*-, *AKT2*- und *AKT3*-Expression in Frage. Diese sollten in weiterführenden Studien auf deren Relevanz untersucht werden, um den zugrundeliegenden Mechanismus aufzuklären.

5.1.2 Die Funktion der Akt-Isoformen unter Einfluss von EGFP-K-Ras(V12)

In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutlich erhöhte basale Akt-Phosphorylierung und Akt3-Kinase-Aktivität in PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Zellklonen im Vergleich zu parentalen Zellen gezeigt werden. Dies deutet auf eine spezifische Funktion von Akt3 hin. Die eigenen Analysen zur Funktion der Akt-Isoformen in der spontanen Migration der PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Zellklone konnten zeigen, dass Akt3 allein die Migration nicht bedeutsam reguliert. Studien in Zelllinien aus anderen Tumorentitäten legen nahe, welche Funktionen Akt3 anstatt dessen einnehmen könnte: In Melanomen konnte eine Akt3-Überexpression und Akt3-Hyperaktivität nachgewiesen werden, welche mit der Kontrolle des Tumorwachstums, des Überlebens und der Metastasierung in eine positive Korrelation gebracht wurde [45,95]. Die Akt3-Überexpression führte in Prostatakarzinomzelllinien zu einer erhöhten Proliferation und beeinflusste die Signaltransduktion, da es zu einer erhöhten Akt-Phosphorylierung führte, die Expression der Akt-Effektoren TSC1 und TSC2 verminderte und die Phosphorylierung der GSK3 β (S9), von mTOR(S2448) und der p70S6K(T421/S424) induzierte [120]. In Brustkarzinomzelllinien führte die Akt3-Depletion zu einem verminderten Zellwachstum durch Hochregulation des Zellzyklus-Inhibitors p27 [96]. Weiterhin wurde Akt3 als wichtiger Regulator der Mitochondrienfunktion identifiziert, da eine Akt3-Depletion in Blasen- und Lungenkarzinomzelllinien zu einer mitochondrialen Dysfunktion führte [98]. Akt3 könnte somit in Zellen mit onkogenem K-Ras(V12), aufgrund der in den vorgelegten Daten gezeigten induzierten Expression und Aktivität, von Bedeutung für zelluläre Prozesse wie Wachstum oder Invasion sein. Da neben einer Induktion der Migration durch EGFP-K-Ras(V12) auch eine erhöhte Invasion nachgewiesen wurde [25], könnte Akt3 hierbei vor allem eine entscheidende Rolle einnehmen. Dies gilt es weiterführend zu analysieren.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch die bedeutsame Rolle von Akt1 und Akt2 für die Migration von PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Zellklonen gezeigt werden. Die Analysen wiesen nach, dass die Migration dieser Zellen partiell von Akt1 und von Akt2 abhängt. In früheren Studien der Arbeitsgruppe konnte Akt2 in der EGFP-K-Ras(V12)-induzierten Migration von PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Zellen durch siRNA-vermittelte Akt2-Depletion bereits als bedeutsam detektiert werden. Der gemeinsame *knockdown* von Akt1 und Akt2 resultierte ebenso in einer reduzierten Migration [32]; diese Erkenntnisse werden durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Somit verstärkt sich die These, dass onkogenes K-Ras vor allem über Akt2 die Migration positiv reguliert. Die pro-migratorische Funktion von Akt2 konnte bereits in Studien mit Brust-, Ovarial-, Prostata-, Lungen- und Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden [80,89,90,93] und bestärkt daher die vorgebrachte These. Viele Studien konnten aber vor allem die onkogene Funktion von Akt2 im Tumorwachstum von Brust-, Leber-, Ovarial- und Lungentumoren nachweisen [93,121,122]. Eine Akt2-Depletion führte in den untersuchten Tumorzelllinien zu vermindertem Wachstum und inhibierte die Proliferation, während kein Einfluss von Akt2 auf die Zellmigration oder Invasion ermittelt werden konnte. Mögliche Effekte von Akt2 auf die Proliferation wurden in den in dieser Arbeit vorgestellten *Wounding-Assays* allerdings durch Behandlung der Zellen mit dem Zytostatikum Mitomycin C ausgeschlossen und kommen als Begründung für die detektierten Effekte nicht in Frage. In anschließenden Studien könnte die spezifische Funktion von Akt2 in der K-Ras(V12)-induzierten Migration, z. B. mit einer Akt2-Überexpression, bestätigt werden. Die Zelllinie PANC-1 eignet sich aufgrund der nachgewiesenen Akt2-Überexpression dazu allerdings nicht. Alternativ könnten MIA PaCa-2 Zellen als Modellzelllinie dienen, da diese Akt2 moderat exprimieren.

5.2. Expression der Akt-Isoformen in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien

In Anknüpfung an die EGFP-K-Ras(V12)-induzierte veränderte Expression der Akt-Isoformen in PANC-1 Zellen wurde die Expression der Akt-Isoformen in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien mit onkogenem K-Ras oder wildtypischem K-Ras analysiert. Die Protein- und mRNA-Analysen zeigten einen differentiellen, Zelllinien-abhängigen Gehalt der Akt-Isoformen. Dabei konnte keine Assoziation von onkogenem K-Ras mit dem Akt-Isoform-Expressionsmuster festgestellt werden. Für die Akt-Kinasen ist bekannt, dass sie neben redundanten Funktionen [50] auch spezifische Funktionen, z. B. in der Regulation der Proliferation, des Metabolismus und der Migration, in Tumorzellen erfüllen [38,55]. Daher kann spekuliert werden, dass eine hohe Expression einer der Akt-Isoformen auf eine spezifische Funktion hindeutet. Am Beispiel der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 wird dies deutlich. Es konnte in den eigenen Expressionsstudien gezeigt werden, dass in dieser Zelllinie eine starke Akt2-Überexpression

vorliegt. Studien in PDACs wiesen eine Amplifikation und Überexpression von *AKT2* in Pankreaskarzinomen nach [41,43] und korrelierten diese Akt2-Überexpression mit einer geringen Überlebensrate [43]. Somit ist Akt2 eine wichtige Funktion in der Tumorgenese von Pankreaskarzinomen zuzusprechen.

5.3 Die Expression von EMT-Markern und der Phänotyp von Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien

Die grundlegende Voraussetzung zur Ausbildung von Metastasen ist die EMT, d.h. die Umwandlung von einem epithelialen, stark vernetzten Zelltyp zu einem mesenchymalen, beweglichen Phänotyp. Mit der phänotypischen Veränderung gehen zwangsläufig starke Veränderungen des Zytoskeletts und der Zell-Zell-Adhäsion einher. Epitheliale Zellen zeichnen sich unter anderem durch die starke Expression von E-Cadherin aus, einem Zell-Zell-Adhäsionsprotein. Mesenchymale Zellen zeigen typischerweise einen hohen Gehalt der Proteine Vimentin, β -Catenin, N-Cadherin und Fibronectin [123,124]. Die grundlegende Charakterisierung der etablierten Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien zeigte eine Assoziation eines hohen E-Cadherin- und niedrigen Vimentin-Gehaltes mit einem epithelialen Phänotyp. *Vice versa* wurde eine hohe Vimentin-Expression in Zusammenhang mit einem mesenchymalen Phänotyp nachgewiesen und somit die Zuordnung dieser EMT-Marker zu einem Phänotyp bestätigt. Einzig in den epithelialen PANC-1 Zellen konnte neben einem hohen E-Cadherin-Gehalt auch viel Vimentin nachgewiesen werden. Der hohe Vimentin-Gehalt könnte mit den vielfältigen Funktionen dieses Proteins zusammenhängen. Neben der Aufrechterhaltung der Rigidität des Zytoskeletts reguliert Vimentin die Expression des EMT-assoziierten Transkriptionsfaktors *Slug* und fördert so die EMT [125]. Die weiteren eigenen Analysen zeigten, dass sich der β -Catenin-Gehalt nicht mit einem Phänotyp in Verbindung bringen lässt. Dies ist vermutlich mit der zweiseitigen Funktion von β -Catenin – einerseits als Bestandteil von Zell-Zell-Adhäsionen und andererseits als Transkriptionsfaktor, der die EMT fördern kann [124] – zu erklären. Somit kann die Expression von EMT-Marker-Proteinen zwar mit dem jeweils zugeordneten Phänotyp konform gehen, stellt jedoch keine feste Regel dar. Daher sollten zur besseren Charakterisierung immer mehrere Markerproteine, wie z. B. zusätzlich N-Cadherin oder Fibronectin, analysiert werden. Zusätzlich könnte sich das Protein Girdin als Marker für mesenchymale Zellen eignen. Die eigenen Analysen in Lungenkarzinomzelllinien zeigten eine Assoziation des Girdin-Gehaltes mit einem mesenchymalen Phänotyp. Daher ist zu diskutieren, dass Girdin wichtig für die Motilität von Lungenkarzinomzellen sein könnte. Diese Hypothese wird durch Studien bestärkt, welche in Fibroblasten nach Girdin-Depletion eine Inhibition der Lamellipodienbildung und eine verringerte Migrationsrate

nachwiesen [83]. Fortführende Studien zur Rolle von Girdin in der Zellmotilität werden in einem aktuellen Projekt in der AG von Prof. Dr. Giehl durchgeführt.

5.4 PI3-K/Akt-abhängige Signalwege in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien

Onkogenes K-Ras triggert in Tumorzellen unter Anderem die Aktivität des MEK-ERK-Signalweges und PI3-K/Akt-abhängiger Signalwege, was die Aktivierung von Prozessen wie Wachstum, Überleben und Migration zur Folge hat [12,13,47]. Neben einer *KRAS*-Mutation konnten auch Mutationen von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie z. B. des *EGFR* als maßgeblich für die Potenzierung der Aktivität der Signalwege identifiziert werden [13,47]. Zur Charakterisierung der Induzierbarkeit der Akt-Kinasen in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien wurden verschiedene Studien durchgeführt.

Die durchgeführten Analysen mit den Wachstumsfaktoren wiesen nach, dass der Akt-S6-Signalweg und der MEK-ERK-Signalweg in Zelllinien mit onkogenem K-Ras (PANC-1, MIA PaCa-2) und wildtypischem K-Ras (COLO-699) durch EGF und/oder IGF-1 induzierbar sind. Dies entspricht den Erwartungen, da die Aktivierung dieser Signalwege durch verschiedene Wachstumsfaktoren bereits gut charakterisiert ist [12,47,107] und zeigt auch, dass in diesen Zelllinien keine konstitutive Aktivität des EGFR bzw. des IGF-1-Rezeptors vorliegt. Da sowohl in Zellen mit onkogenem K-Ras und wildtypischem K-Ras eine Induktion des Akt-S6- und des MEK-ERK-Signalweges erfolgten, ist zu diskutieren, dass Akt- bzw. MEK-ERK-abhängige Signalwege nicht zwangsläufig durch das alleinige Vorhandensein von onkogenem K-Ras konstitutiv aktiv vorliegen, wie es als Standard-Modell in der Literatur beschrieben ist [14]. Diese Thesen werden auch von Logsdon und Lu in einem aktuellen *Review*-Artikel vertreten: Es wird ausgeführt, dass die Induzierbarkeit der K-Ras-Aktivität essentiell ist und nicht die Mutation alleine für die Hyperaktivität nachgeschalteter Signalwege verantwortlich sein kann [14]. Für Pankreaskarzinomzelllinien ist dies auch belegt, da das Vorhandensein von K-Ras-GTP, d.h. aktivem K-Ras oder die Überexpression von onkogenem K-Ras nicht zu einer erhöhten ERK1/2-Aktivität führte, der MEK-ERK-Signalweg aber durch EGF oder Lyso-phosphatidsäure induziert werden konnte [25,107]. Einzig die in dieser Arbeit vorgestellten Analysen der Zelllinie H23 (K-Ras G12C) dokumentierten eine basale, nicht weiter induzierbare Aktivität von ERK1/2 und S6. Daher kann diskutiert werden, dass onkogenes K-Ras in H23 Zellen zu einer konstitutiven Aktivität des MEK-ERK-Signalweges führen könnte. Zur Verifizierung dieser These benötigt es aber weiterführende Analysen, in denen das onkogene K-Ras z. B. depletiert wird.

5. Diskussion

Zur spezifischen Charakterisierung Akt-abhängiger Signalwege in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien wurde die pharmakologische Substanz SC-79 in weiteren Analysen verwendet. Hierbei handelt es sich um ein PIP-3-Mimetikum, welches direkt an die PH-Domäne der Akt-Kinasen bindet und die für die Akt-Aktivierung nötige Phosphorylierung an T308 und S473 ermöglicht. Analysen von Jo *et al.* konnten belegen, dass die Bindung von SC-79 an die Akt-PH-Domäne im Zytosol erfolgt und alle drei Akt-Isoformen phosphoryliert werden können [100]. Die biochemischen Analysen SC-79-behandelter Pankreas- und Lungenkarzinomzellen in dieser Arbeit bestätigten die Wirksamkeit des Akt-Aktivators SC-79 anhand der konzentrations- und zeitabhängigen Induktion der Akt-Phosphorylierung an S473. Mittels der Akt-Kinase-Assays konnte, in Abhängigkeit von der Zelllinie, eine differentielle SC-79-induzierte Kinase-Aktivität der Akt-Isoformen gezeigt werden und dies die Wirksamkeit des Akt-Aktivators ebenso belegen. Die Akt-Aktivierung war sowohl in Zelllinien mit onkogenem K-Ras (PANC-1, H23, MIA PaCa-2) als auch in Zelllinien mit wildtypischem K-Ras (COLO-699) möglich. Diese Ergebnisse bestätigten somit eine Induzierbarkeit der Akt-Phosphorylierung, die in den vorangegangenen Analysen mit den Wachstumsfaktoren gezeigt wurden.

Die eigenen Analysen von Akt-abhängigen Signalwegen konnten nachweisen, dass S6 in PANC-1, COLO-699 und COLO 357 Zellen ein Akt-regulierter Effektor ist. Durch die Verwendung von spezifischen Inhibitoren der PI3-K, der Akt-Kinasen und von mTOR konnte für PANC-1 und COLO-699 Zellen gezeigt werden, dass die PI3-K über Akt und mTOR die S6-Phosphorylierung reguliert. Der PI3-K/Akt-mTOR-S6-Signalweg ist bereits gut charakterisiert und mTOR als indirektes Akt-Substrat beschrieben, da aktives Akt TSC2 phosphoryliert und damit dessen inhibitorische Wirkung auf den mTORC1 aufhebt [47,50,58]. In den weiteren eigenen Analysen wurde aber auch gezeigt, dass eine hohe Diversität der Akt-regulierten Signalwege und von Akt-Effektoren in Abhängigkeit von der Zelllinie vorliegt: In den Analysen mit COLO 357 Zellen wurde die S6-Phosphorylierung zwar durch die Akt-Aktivierung induziert und durch Akt-Inhibition gehemmt, war aber nicht durch eine Rapamycin-Behandlung beeinflusst. Dies impliziert eine mTOR-unabhängige Regulation der S6-Phosphorylierung durch Akt. Weiterhin wurde in den Analysen mit SC-79-behandelten H23 Zellen keine Induktion der S6-Phosphorylierung festgestellt. Die weiteren Analysen von H23 Zellen konnten die Akt-abhängige Aktivierung der p70S6K bestätigen und so die Regulation der S6-Phosphorylierung durch mTOR nachweisen. Somit ist zu schlussfolgern, dass die basale S6-Phosphorylierung in H23 Zellen zwar vom mTOR-p70S6K-Signalweg abhängt, jedoch primär nicht durch Akt reguliert ist. Da der MEK-ERK-Signalweg in H23 konstitutiv aktiv vorliegt, kann diskutiert werden, dass die S6-Aktivität von der MEK-ERK-Signalkaskade abhängen könnte. Studien in HEK293 Zellen bestärken diese These, da hier eine MEK-ERK-abhängige Phosphorylierung von S6 nach Serum- oder EGF-Behandlung nachgewiesen wurde [126].

5. Diskussion

Diese Studie konnten die *p90-ribosomal-S6-kinases* (RSK) als Mediatoren der MEK-ERK-abhängigen S6-Phosphorylierung an S235/236 nachweisen [126]. Weiterhin wurde als möglicher alternativer Mechanismus eine RSK-induzierte TSC2-Inhibition nachgewiesen, die ebenso die S6-Phosphorylierung über die Aktivierung von mTORC1 induzieren könnte [127].

In den eigenen Analysen weiterer Akt-abhängiger Effektoren konnte MDM2 als Akt-Substrat in den Zelllinien PANC-1 und COLO-699 identifiziert werden, da es an S166 nach der SC-79-induzierten Akt-Aktivierung phosphoryliert wurde. Die vorgelegten Daten sind konsistent mit einer Studie von Mayo und Donner, die zeigen konnten, dass Akt direkt mit MDM2 interagieren kann und es an S166 phosphoryliert, um dessen Lokalisierung in den Zellkern zu ermöglichen [61].

Die Analysen Akt-abhängiger Signalwege dokumentierten in COLO-699 und H23 Zellen ein positives *Feedback* der mTOR-Inhibition auf die Akt-Phosphorylierung. Dieser *Feedback*-Mechanismus ist bereits gut untersucht und wurde durch Shi *et al.* in multiplen Myelomzellen [59] oder auch durch O'Reilly *et al.* in Prostata- und Brustkarzinomzelllinien unter Verwendung verschiedener mTOR-Inhibitoren gezeigt [60]. Die Studien zeigten, dass die Inhibition von mTOR zu einer Aktivierung des *insulin receptor substrates 1* (IRS-1) führt, welche wiederum die PI3-K aktiviert und die Akt-Phosphorylierung induziert [59]. Solche *Feedback*-Mechanismen sind vor allen Dingen in der Tumorthherapie zu beachten, da es aufgrund der Reaktivierung Akt-abhängiger Signalwege zu einer verringerten Effektivität der Therapie kommen kann [65]. Studien, die eine Effektivität einer dualen Inhibition von mTOR und der PI3-K oder der Akt-Kinasen in Cholangiom- und Leberkarzinomzelllinien analysierten, konnten einen Synergismus der dualen Inhibition nachweisen [128,129]. Das Vorhandensein eines *Feedback*-Mechanismus kann somit maßgeblich für einen Therapieerfolg sein und zeigt die hohe Relevanz der Kenntnis der basalen Signaltransduktion für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren.

Die vorgelegten eigenen Daten, als auch die vorgestellten Studien zeigen somit auf, dass die Akt-abhängige Signaltransduktion zelltyp-spezifisch ist und verdeutlichen die Notwendigkeit der Aufklärung zugrundeliegender molekularer Mechanismen der jeweils veränderten Signalkaskaden. So könnten spezifische Therapien entwickelt werden, die an die beteiligten Proteine der jeweils vorliegenden Signaltransduktion angepasst sind.

5.5 Interaktion der Akt-Kinasen mit dem MEK-ERK-Signalweg

In der Therapie von Karzinomen wurden Akt1, Akt2 und Akt3 als essentielle Signaltransduktoren bereits als *Drug Targets* untersucht. Erste *in vitro* Studien mit pan-Akt-Inhibitoren zeigten gute Effizienzen, verfehlten ihre Wirkung jedoch in klinischen Studien,

5. Diskussion

vermutlich aufgrund von erworbenen Resistenzen [50,66]. Ein Hauptmechanismus einer Resistenz ist die Aktivierung alternativer Signalwege. Nach Akt-Inhibition konnte in bisherigen Studien unter anderem die Aktivierung des MEK-ERK-Signalweges beobachtet werden [65,67].

In der vorliegenden Arbeit konnte nach direkter Akt-Aktivierung durch SC-79 eine Beeinflussung der ERK1/2-Phosphorylierung in den analysierten Zelllinien nachgewiesen werden. Die SC-79-induzierten Effekte auf die ERK1/2-Phosphorylierung fielen in Abhängigkeit von der verwendeten SC-79-Konzentration und der analysierten Zelllinie allerdings unterschiedlich aus. Die durch geringe SC-79-Konzentrationen induzierte, zeitabhängige ERK1/2-Aktivierung in PANC-1, COLO-699 und COLO 357 Zellen konnte in den eigenen Studien als MEK1/2-vermittelt identifiziert werden. Somit könnte Akt direkt mit MEK1/2 interagieren und anschließend ERK1/2 phosphorylieren oder es handelt sich bei der SC-79-induzierten MEK1/2-Aktivierung um einen *Off-Target* Effekt von SC-79. Die letztgenannte Möglichkeit liegt nahe, da die getesteten SC-79-Konzentrationen unterschiedliche Effekte auf die ERK1/2-Phosphorylierung zeigten. Da SC-79 direkt an die PH-Domäne von Akt bindet [100], könnte es unspezifisch auch an MEK1/2 oder im Signalweg oberhalb gelegene Proteine, wie die Raf-Proteine, binden. Eine aktuelle Studie konnte nachweisen, dass die Akt-Kinasen und MEK1/2 aber auch direkt interagieren können [130], was die Hypothese der Akt-induzierten MEK1/2-Aktivierung unterstützt. Um die mögliche Interaktion zwischen den Akt-Kinasen und MEK1/2 näher zu charakterisieren, müssten *in vitro*-Bindungsstudien durchgeführt werden. Auch nach Akt-Inhibition konnte in den Analysen von PANC-1 Zellen eine Aktivierung von ERK1/2 nachgewiesen werden, was die hohe Komplexität der Signaltransduktionsnetzwerke verdeutlicht. In Studien zur Effizienz des dualen PI3-K/mTOR-Inhibitors BEZ235 konnte ebenso eine Hyperaktivierung von ERK1/2 beobachtet werden [131]. Die Analyse des zugrunde liegenden Mechanismus der Akt-Inhibitor-vermittelten ERK1/2-Aktivierung zeigte, dass der mTORC2-Komplex eine zentrale Rolle spielt. Nach Depletion von *RICTOR*, einer Komponente des mTORC2, konnte eine verminderte Phosphorylierung von ERK1/2 detektiert werden [131].

Die eigenen Analysen und die vorgestellten Studien zeigen somit die starke Vernetzung des MEK-ERK-Signalweges und von Akt-abhängigen Signalwegen. Daher sollte bei einem Eingriff in einen dieser Signalwege – wie in Tumorthherapie durch Verwendung verschiedener Akt- oder MEK-ERK-Inhibitoren – immer die Reaktion daran gekoppelter Signalwege untersucht werden um mögliche *Feedback*-Mechanismen zu identifizieren und Resistenzen zu vermeiden.

5.6 Die distinkte Kinase-Aktivität von Akt1, Akt2 und Akt3

Zur Analyse der isoformspezifischen Aktivität der drei Akt-Isoformen in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien wurden Akt-Kinase-Assays durchgeführt. Die Analysen belegten eine Zelllinien- und Stimulus-abhängige Kinase-Aktivität der Akt-Isoformen. Auffallend wurde in den Zelllinien COLO-699, H23 und MIA PaCa-2 eine deutliche SC-79-, EGF- und/oder IGF-1-induzierte Akt3-Aktivität nachgewiesen. Dies suggeriert, dass Akt3 eine spezifische Funktion erfüllen könnte. Eine spezifische Funktion von aktivem Akt1 und Akt3 konnte bereits in Studien von Grabinski *et al.* gezeigt werden: In DTCs wurde eine hohe Akt3-Aktivität nachgewiesen und die Akt1-, aber vor allem die Akt3-Depletion führte zur verminderten Proliferation und Überleben dieser Zellen [101].

Für die These der spezifischen Funktion der Akt-Isoformen spricht auch die festgestellte Stimulus-abhängige Aktivität von Akt2: Die IGF-1-Behandlung führte in PANC-1 Zellen einzig zur Akt2-Aktivierung. In Studien zur Akt-isoformspezifischen Regulation des Glukose-Metabolismus konnte die spezifische Funktion von Akt2 gezeigt werden. *In vitro* Studien in 3T3-L1 Adipozyten konnten nachweisen, dass ausschließlich eine siRNA-vermittelte Akt2-Depletion, nicht aber eine Akt1- oder Akt3-Depletion, zu einer verminderten Insulin-induzierten Translokation des GLUT4-Glukose-Transporters zur Plasmamembran führte und so die Glukose-Aufnahme inhibierte [132,133].

Die eigenen Analysen von PANC-1 Zellen zeigten jedoch auch eine EGF-induzierte, distinkte Aktivität aller Akt-Isoformen. Akt1 zeigte im direkten Vergleich die höchste relative EGF-induzierte Aktivität. Für die Interpretation der Analysen von PANC-1 Zellen ist der deutlich unterschiedliche Gehalt der Akt-Isoformen allerdings zu bedenken: Akt2 wird viel stärker exprimiert, als Akt1 und Akt3, was der Einsatz der Lysatmengen zur gleichmäßigen Präzipitation in den Kinase-Assays nachwies. Einzelne Versuche zeigten bei Präzipitation der Akt-Isoformen aus gleichen Lysatmengen eine deutlich höhere EGF-induzierte Akt2-Aktivität als die EGF-induzierte Akt1- oder Akt3-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Da die Akt2-Überexpression in PDACs bereits mit einer hohen Mortalität korreliert wurde [43], kann diskutiert werden, dass Akt2, aufgrund der höheren Verfügbarkeit innerhalb der Zellen und der nachgewiesenen Kinase-Aktivität, eine bedeutsamere Rolle als die anderen beiden Akt-Isoformen einnimmt, auch wenn diese eine induzierbare Aktivität zeigen.

Weiterhin könnte aber auch die subzelluläre Lokalisation von Akt1, Akt2 und Akt3 für die distinkte Kinase-Aktivität eine Rolle spielen. Bei Verwendung des pan-Akt-Aktivators SC-79 wurde entgegen der Erwartungen gezeigt, dass trotz der Expression der drei Akt-Isoformen in den Zelllinien H23, COLO-699 oder MIA PaCa-2 nicht alle drei Akt-Kinasen auch aktiviert wurden. Da es sich bei SC-79 um einen zytosolischen Akt-Aktivator handelt [100], besteht die

5. Diskussion

Möglichkeit, dass die jeweils nicht aktivierten Isoformen in zu geringer Menge oder gar nicht im Zytosol vorlagen. Die subzelluläre Verteilung der Akt-Isoformen konnte von Santi *et al.* in Leber-, Brust- und Prostata-Karzinomzelllinien gezeigt werden. Hier wurde eine mitochondriale Lokalisation von aktivem Akt2 und eine hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisation von Akt1 nachgewiesen. Akt3 befand sich primär in der nukleären Membran und dem Nukleus [76]. Die Depletion einer der Isoformen beeinflusste die Lokalisation der anderen beiden Isoformen nicht [76] und bestärkt wiederum die These einer spezifischen Funktion. Weiterführende Studien zur subzellulären Lokalisation von Akt1, Akt2 und Akt3 in Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien sind zur Aufklärung des Einflusses der subzellulären Verteilung auf die spezifische Aktivität somit notwendig.

5.7 Die Bedeutung der Akt-Kinasen und des Akt-Effektors mTOR für die Migration

Die Akt-Kinasen wurden in einer Vielzahl an Studien als bedeutsam für die Migration und Invasion von Karzinomzellen verschiedener Tumorentitäten beschrieben [89,90,113,134]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Akt-Kinasen in der Migration von PANC-1, H23 und COLO-699 durch Verwendung des Akt-Aktivators SC-79 und des Akt-Inhibitors AktVIII in *Wounding-Assays* untersucht.

In den Migrationsstudien mit SC-79-behandelten Zellen konnte entgegen der Erwartungen lediglich die Tendenz einer erhöhten Migration von H23 und PANC-1 Zellen ermittelt werden. SC-79 induziert die Phosphorylierung der Akt-Kinasen für maximal 1 h, was einzelne Versuche mit PANC-1 Zellen belegen konnten (Daten nicht gezeigt). Der Prozess der Migration benötigt jedoch die komplexe Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, welche durch verschiedenste Signalmoleküle gesteuert werden [6,135]. Die nur kurzzeitig vorliegende Akt-Aktivierung und die möglicherweise zu kurze Aktivierung nachgeschalteter Prozesse könnte daher eine mögliche Erklärung für die kaum veränderte Migrationsrate darstellen. Denn die eigenen Analysen konnten nach Behandlung der Zellen mit den Akt-Inhibitor AktVIII über 24 h sowie 48 h eine deutliche Inhibition der Migration von PANC-1 und COLO-699 Zellen zeigen. Da die eigenen Phosphorylierungsstudien die langfristige Wirksamkeit dieses Inhibitors (mindestens 15 h) nachweisen konnten, ist davon auszugehen, dass die Akt-Kinasen eine bedeutsame Rolle in der Migration dieser Zellen einnehmen. Die Bedeutung der Akt-Kinasen für die Migration von Karzinomzellen wird auch von verschiedenen Studien bestätigt. Durch Inhibition der Akt-Kinasen mit Perifosine wurde eine verminderte Migration und Invasion von einigen PDAC-Zelllinien gezeigt [136]. *Vice versa* konnte in Pankreaskarzinomzelllinien durch Überexpression von aktivem Akt1 oder aktivem Akt2 eine erhöhte Invasivität nachgewiesen werden [89]. Zusätzlich konnte in MIA PaCa-2 Zellen der PI3-K/Akt-Signalweg als einer der

5. Diskussion

K-Ras-induzierten Schlüsselsignalwege identifiziert werden, der Migration und Invasion steuert [27]. Dass die Akt-Kinasen die Migration von PANC-1 und COLO-699 Zellen jedoch nicht allein regulieren, wird in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auch deutlich, da die Migration nicht vollständig durch die Akt-Inhibition gehemmt wurde. Die immunhistochemischen Färbungen und das *live-cell imaging* SC-79-behandelter HCC-44 Zellen konnten aber nachweisen, dass die SC-79-vermittelte Akt-Aktivierung die Auflösung des kortikalen Aktins und die Lamellipodienbildung induzierte. Diese Akt-induzierte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts deutet darauf hin, dass die Akt-Kinasen durch die Regulation des Aktin-Zytoskeletts an der Regulation der Migration beteiligt sein könnten. Welche Effektor-Signalwege in der Akt-regulierten Motilität eine Rolle spielen könnten wurde in den weiteren Analysen untersucht.

In Migrationsstudien mit NSCLC-Zelllinien wurde gezeigt, dass durch überexprimiertes S6, ein Akt-mTORC1-reguliertes Substrat, die Migration und Invasion propagiert wird [112]. Daher könnte der Akt-mTOR-S6-Signalweg in der Migration von COLO-699 und H23 Zellen eine Rolle spielen. Die Studien von Chen *et al.* konnten nach S6-Überexpression außerdem eine erhöhte Menge an phospho-Paxillin, Vimentin, N-Cadherin und Matrix-Metallo-Proteinase-2 sowie eine Herunterregulation der E-Cadherin-Expression nachweisen. Diese Proteine regulieren die Zell-Zell-Adhäsion und die Interaktion mit der extrazellulären Matrix und sind essentiell für den Migrationsprozess. Studien in Oesophagus-Karzinomzellen bestätigten die pro-invasive Funktion von S6 [137]. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass mTORC1 durch die Inhibition der PP2A und nachfolgend durch die Aktivierung von ERK1/2 die Zellmotilität fördern kann [111]. Die eigenen Migrationsstudien zur Rolle des mTOR-S6-Signalweges zeigten jedoch keinen signifikanten Effekt einer Rapamycin-Behandlung auf die Migration von COLO-699 Zellen. Da die Rapamycin-vermittelte Inhibition von mTOR anhand der verminderten S6-Phosphorylierung in den eigenen Studien eindeutig nachgewiesen wurde, ist der mTOR-S6-Signalweg in COLO-699 Zellen nicht als bedeutend für die Akt-regulierte Migration zu bewerten. In den Analysen von H23 Zellen konnte hingegen eine deutlich erhöhte Migrationsrate nach mTOR-Inhibition ermittelt werden. Dies entspricht, aufgrund der bekannten Studien, nicht den Erwartungen und bedarf weiterführender Studien. Um die vorgelegten Ergebnisse zu bekräftigen, sollten Migrationsstudien mit alternativen mTOR-Inhibitoren oder mit siRNA-vermittelter mTOR-Depletion durchgeführt werden.

5.8 Die Rolle der Akt-Isoformen in der Regulation der Migration

Studien in Prostata-, Brust-, Kolon- und auch Melanom-Zelllinien wiesen nach, dass den Akt-Isoformen in der Migration und Invasion spezifische Funktionen zuzuordnen sind [80,86,97,113,138].

5. Diskussion

Die Ergebnisse in dieser Arbeit legen nahe, dass Akt1 eine pro-migratorische Rolle in der spontanen Migration von PANC-1 und H23 Zellen einnimmt. Die in den Analysen ermittelten Unterschiede in der gewanderten Strecke erwiesen sich insgesamt allerdings als geringfügig und können nur eine Tendenz aufzeigen. Die relativ gering migrierte Strecke könnte mit dem Transfektionsstress zusammenhängen. Hinweise darauf ergeben sich durch einzelne Versuche, in denen untransfizierte PANC-1 und H23 Zellen um 5-10 % schneller migrierten, als siScrbld-transfizierte Zellen (Daten nicht gezeigt). Somit sollten die Versuche zur Bekräftigung der Ergebnisse unter anderen Bedingungen wiederholt werden. Um die Stresseffekte der Lipofektion zu minimieren, könnte eine stabile Depletion der Akt-Isoformen über die Methode CRISPR/Cas oder eine alternative Transfektionsmethode, wie die lentivirale Transfektion mit sh-RNA erfolgen.

Durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergeben sich aber trotz dessen Hinweise darauf, dass Akt1 in PANC-1 und H23 Zellen pro-migratorisch wirkt. In Forschungsarbeiten von Grabinski *et al.* konnte in DTCs auch ein negativer Effekt nach Akt1- sowie auch nach Akt2- oder Akt3-Depletion auf die Migration ermittelt werden [101]. Im Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen steht allerdings eine aktuelle Studie von Rao *et al.*, die zeigt, dass die siRNA-vermittelte Akt1-Depletion in NSCLC-Zelllinien mit *KRAS*- oder *EGFR*-Mutation zu einer erhöhten basalen Migrationsrate führte [79]. Um die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zu bestätigen, sollten – neben der Anpassung der Assay-Bedingungen – ebenso Analysen erfolgen, in denen der Effekt von aktivem Akt1 auf die Migration, induziert z. B. durch eine Überexpression, untersucht wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Akt2- bzw. Akt3-Depletion kein bedeutsamer Effekt auf die spontane Migration von PANC-1 oder H23 Zellen ermittelt. In COLO-699 Zellen zeigte keine der isoformspezifischen Akt-Depletionen einen Effekt auf die Migration. Es ist daher auch zu diskutieren, dass nicht die einzelnen Akt-Isoformen die Migration regulieren, sondern eine Kooperation von zwei oder allen drei Akt-Isoformen vonnöten ist, wie es auch Grottke *et al.* darlegen [97]. In deren Studien wurde die Migration von TNBCs nach einem simultanen *knockdown* von Akt2 und Akt3 stärker induziert als nach alleinigem *knockdown* von Akt3. Hinweise darauf, dass eine überlappende Funktion der einzelnen Akt-Isoformen in der Regulation der spontanen Migration der analysierten Zelllinien vorliegt, ergeben sich durch die Tatsache, dass die Inhibition der drei Akt-Isoformen durch den Akt-Inhibitor AktVIII in einer deutlich verringerten Migrationsrate von PANC-1 und COLO-699 Zellen resultierte.

5.9 Die Rolle von MDM2 und p53 in der Migration

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit ergibt sich die Erkenntnis, dass die Akt-Kinasen die Migration der analysierten Zelllinien nicht allein regulieren. In Vorarbeiten der AG Giehl konnte MDM2 als bedeutsamer Faktor für die Migration von PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-Zellklonen identifiziert werden (unveröffentlichte Daten). Studien in Brustkarzinomzellen zeigten, dass Akt1 die Migration und Invasion teilweise über eine MDM2-vermittelte Degradation von NFAT1 inhibiert [63]. Eine pro-migratorische Rolle von MDM2 konnte in Kolon- und Lungenkarzinomzelllinien festgestellt werden, wobei die Aktivierung von p53 dabei als bedeutsam identifiziert wurde [116]. In weiteren Studien konnte in p53wt-Zellen ein Zellzyklus-Arrest aufgrund der Nutlin-3-induzierten p53-Aktivierung festgestellt werden [115,116]

Die Funktionen von MDM2 und p53 in der Migration wurde in dieser Arbeit mithilfe von spezifischen Inhibitoren in *Wounding-Assays* analysiert. Der MDM2-Inhibitor Nutlin-3 bindet an die p53-Bindestelle von MDM2 und verhindert so die MDM2-p53-Interaktion. Dadurch wird p53 stabilisiert und akkumuliert in der Zelle, zusätzlich wird MDM2 durch die Nutlin-Bindung stabilisiert und akkumuliert im Zytosol [116]. In verschiedenen Karzinomzelllinien mit TP53wt, darunter Kolon- und Lungenkarzinomzellen, zeigte sich nach Verwendung von Nutlin-3 eine Reduktion der gerichteten Migration und Invasion in Chemotaxis-Experimenten. Weiterhin zeigten die Nutlin-3-behandelten Zellen eine verminderte Bildung von Lamellipodien und eine reduzierte F-Aktin-Bildung sowie eine verringerte Ausbildung von fokalen Kontakten [116]. Die Migrationsstudien in der vorliegenden Arbeit konnten keinen bedeutsamen Effekt von Nutlin-3 auf die Migration von H23, COLO-699 und PANC-1 Zellen nachweisen. Ein möglicher Grund dafür ist, dass MDM2 nicht mit p53mt interagieren könnte, welches in den analysierten Zellen vorliegt. Somit könnte es sein, dass die MDM2-Inhibition p53mt nicht aktiviert und daher die Migration nicht beeinflusst wird. Da die biochemischen Analysen des p53-Gehaltes von Nutlin-3-behandelten Zellen auch keinen bedeutsam veränderten p53-Gehalt zeigten, untermauert dies die These der fehlenden Nutlin-3-vermittelten Aktivierung von p53mt. In Analysen mit H23 Zellen und in einzelnen Versuchen mit PANC-1 Zellen (Daten nicht gezeigt) konnte aber ein erhöhter MDM2-Gehalt nach Nutlin-3-Behandlung nachgewiesen werden, was zumindest die stabilisierende Wirkung von Nutlin-3 auf MDM2 nachweist. Weiterhin zeigten die Nutlin-3-behandelten PANC-1 Zellen keine veränderte Konfluenz, was nahelegt, dass die Proliferation der Zellen und somit p53mt durch die Behandlung nicht beeinflusst sein könnte. Diese Hypothese wird für PANC-1 Zellen durch Studien von Sui *et al.* unterstützt. Hier zeigte Nutlin-3 keinen Effekt auf das Überleben und die Proliferation von PANC-1 Zellen [139]. Folglich können in PANC-1 durch Nutlin-3-Behandlung vermutlich ausschließlich p53-unabhängige MDM2-Effekte untersucht werden.

5. Diskussion

Nimmt man dies an, so ist MDM2 allein vermutlich nicht in die Regulation der Migration dieser Zellen involviert. Einzig in H23 Zellen könnte Nutlin-3 auf p53mt wirken: die Nutlin-3-behandelten H23 Zellen lösten sich innerhalb von 24 h – 48 h nach Behandlung von der Plastikoberfläche, aufgrund dessen die Apoptose der Zellen vermutet werden kann. Dies deckt sich mit Studien von Ambrosini *et al.* [140] und Saha *et al.* [141], die in verschiedenen Karzinomzellen die Apoptose-Induktion durch Nutlin-3-stabilisiertes p53 nachweisen konnten. Zur Verifizierung der These, dass MDM2 keine Funktion in der Migration dieser Zellen übernimmt, sollten allerdings weitere Studien mit alternativen MDM2-Inhibitoren oder einer siRNA-vermittelten MDM2-Inhibition durchgeführt werden.

Die eigenen Analysen zur Bedeutung von p53mt in der Migration wurden mit dem p53-Inhibitor, Pifithrin- α durchgeführt. Für Pifithrin- α ist beschrieben, dass es die transkriptionelle Aktivität von p53 inhibiert [142,143] und somit die Expression des p53-regulierten *MDM2* beeinflussen sollte. Die vorgelegten Daten zeigten in den behandelten Zelllinien keine veränderte *MDM2*-Expression nach Pifithrin- α -Behandlung. Daher gilt es zu prüfen, ob Pifithrin- α die transkriptionelle Aktivität von p53mt überhaupt beeinflusst. Dazu müsste die Expression weiterer p53-regulierter Gene (z.B. *p21* oder *PUMA*) analysiert werden. Trotz der nicht nachweisbaren Wirksamkeit von Pifithrin- α konnte in den Migrationsanalysen ein Effekt der Behandlung detektiert werden. Für H23 Zellen wurde eine erhöhte Migrationsrate und für COLO-699 und PANC-1 Zellen eine Inhibition der Migration nach Pifithrin- α -Behandlung ermittelt. Ob es sich allerdings um einen p53-vermittelten Effekt handelt, lässt sich aufgrund der vorliegenden Daten nicht abschließend klären. Allerdings ist die p53-Mutante R273H, die in PANC-1 Zellen vorhanden ist, in anderen Zelllinien als migrationsfördernd beschrieben [144], was die These einer pro-migratorischen Funktion von p53mt in PANC-1 Zellen unterstützt. Pifithrin- α -behandelte H23 Zellen zeigten im Zeitraum von 24 h – 48 h die Ablösung von der Kulturoberfläche, was eine Apoptose der Zellen nahelegt. Diese könnte p53-induziert sein, wie es auch Studien von Saha *et al.* darlegen [141]. Hier führte die gleichzeitige Pifithrin- α - und Nutlin-3-Behandlung multipler Myelomzellen zu einer höheren Apoptoserate, als die Nutlin-3-Behandlung allein. Dieser Effekt wurde auf die mitochondriale Lokalisation von p53 und die damit induzierte Apoptose zurückgeführt [141]. Dies gibt Hinweise darauf, dass Pifithrin- α in H23 Zellen auf p53mt wirkt. Da die eigenen Analysen Hinweise auf eine pro-migratorische Rolle von p53mt in der Migration von PANC-1 und COLO-699 Zellen geben, sollte der zugrunde liegende molekulare Mechanismus in weiterführenden Analysen untersucht werden.

5.10 Mechanismen der Regulation von Migrationsprozessen durch Akt

5.10.1 Interaktion von Akt mit dem Aktin-Zytoskelett

Die Zellbewegung ist ein hochkomplexer Prozess, in dem das Aktin-Zytoskelett so umstrukturiert werden muss, dass eine gerichtete Fortbewegung der Zelle möglich ist. Es ist bekannt, dass Akt das Aktin-Zytoskeletts über eine Vielzahl von verschiedenen Mechanismen regulieren kann [6,8,135]. In der vorliegenden Arbeit konnte nach SC-79-induzierter Akt-Aktivierung in Lebendzell-Aufnahmen und immunhistochemischen Färbungen die zeitnahe Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien und eine strukturelle Veränderung des Aktin-Zytoskeletts nachgewiesen werden, da sich das kortikale Aktin-Netzwerk auflöste und ein diffuses Aktin-Netzwerk zu beobachten war. Somit konnte die Akt-abhängige Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts in diesen Zellen gezeigt werden. Wie die Akt-Kinasen die strukturellen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts induzieren könnten, kann anhand verschiedener Studien diskutiert werden. Eine mögliche Variante stellt die direkte Interaktion von Akt mit Aktin dar, da Aktin in einer Studie von Vandermoere *et al.* bereits als direktes Akt-Substrat in Brustkarzinomzellen identifiziert wurde. Außerdem wurde nach Akt-Depletion die wachstumsfaktor-induzierte Reorganisation des kortikalen Aktins inhibiert [145]. Weiterhin könnte Akt auch über Adapter- oder Gerüstproteine die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts regulieren. Das Aktin-bindende Protein Girdin konnte als direktes Akt1-Substrat in Fibroblasten identifiziert werden. Die Depletion von Girdin führte zur Inhibition der Ausbildung von Lamellipodien und verringerte die Migrationsrate [83]. Weitere Mechanismen in der Migration sind in Brustkarzinomzellen untersucht. Hier konnte interessanterweise eine spezifische Funktion von Akt1 und Akt2 in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts festgestellt werden. Mittels stabiler Akt2-Depletion wurde die Zellmigration durch Herunterregulation von F-Aktin und Vimentin reduziert, während nach Akt1-Depletion die Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* (FAK) und die Expression von β 1-Integrinen hochreguliert wurden und die Migration induziert wurde [146]. Chin *et al.* konnte die Regulation von β 1-Integrinen durch Akt2 in *knockout*-Studien ebenso zeigen [88]. In Ovarialkarzinomen konnte nachgewiesen werden, dass Akt2 die Hochregulation von β 1-Integrinen induzierte und dadurch die Migration förderte [86], während in Prostatakarzinomzellen sowohl Akt1, als auch Akt2 die Expression von β 1-Integrinen steuern [138]. Die FAK sowie die β 1-Integrine spielen eine entscheidende Rolle im Prozess der Migration, da sie für die Ausbildung von fokalen Adhäsionen und Zell-Matrix-Assoziation von zentraler Funktion sind. Ebenso konnte in Brustkarzinomzellen das Aktin-regulierende Protein Palladin als Akt1-spezifisches Substrat identifiziert werden [78].

5.10.2 Die Rolle putativer Akt3-Substrate in der Regulation der Migration

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse der Phospho-Akt-Substrat-Proteom-Analyse zeigten starke Veränderungen des Phospho-Akt-Substrat-Proteoms SC-79-behandelter H23 Zellen, was auf eine Vielzahl an putativen Akt-Substraten hindeutet. Dies ist aufgrund der beschriebenen, vielfältigen Funktionen der Akt-Kinasen und der vielen bekannten Akt-Substrate [50] entsprechend den Erwartungen. Da die Behandlung mit siAkt3 + SC-79 im Vergleich zur SC-79-Behandlung eine geringfügigere Veränderung der Phosphorylierung der Peptide induzierte, kann vermutet werden, dass die Effekte der SC-79-Behandlung auf das Phospho-Akt-Substrat-Proteom weitestgehend Akt3-abhängig sind. Dass jedoch vermutlich auch Akt3-unabhängige SC-79-Effekte auf das Phospho-Proteom vorhanden sind, zeigte die Veränderung des Phospho-Proteoms im Vergleich der Proben siAkt3 + SC-79 vs. DMSO. Diese Effekte könnten durch Akt1 oder Akt2, aber auch durch *Off-Target*-Effekte von SC-79 hervorgerufen sein. Zur Überprüfung dieser Thesen müssten Akt1 und Akt2 allerdings noch simultan depletiert sowie zusätzlich auch alle drei Akt-Kinasen inhibiert werden, und anschließend die Effekte auf das Phospho-Akt-Substrat-Proteom untersucht werden. Die Verifizierung der Ergebnisse des Proteom-Scans, die mithilfe der Immunblot-Analysen ausgewählter Akt-Substrate durchgeführt wurden, konnte für die Mehrzahl der ausgewählten Proteine, die im Proteom-Scan gemessenen Veränderungen bzw. unveränderten Phospho-Peptide bestätigen. Dass nicht alle Veränderungen, welche im Proteom-Scan gemessen wurden, im Immunblot stets nachweisbar sind, könnte mit der Spezifität der verwendeten Antikörper und der Sensitivität der Detektionssysteme zusammenhängen. Aufgrund dessen könnten geringe Unterschiede in der Phosphorylierung, wie die im Proteom-Scan detektierte Veränderung des GSK3 β -Phosphopeptids, im Immunblot nicht ermittelt werden.

Die weitere Datenauswertung zeigte, dass die Funktion einer Vielzahl der zugeordneten Proteine in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts liegt und suggeriert, dass die Akt-Kinasen an der Regulation von Aktin-assoziierten Proteinen beteiligt sein könnten. Die Daten der Immunhistochemie und des *live-cell imagings* bestärken diese These, da nach SC-79-induzierter Akt-Aktivierung eine zeitnahe Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und die Filopodien-Ausbildung von HCC-44 Zellen dokumentiert werden konnte. Welche spezifischen Akt-Substrate für die Vermittlung der Akt-induzierten Effekte auf das Aktin-Zytoskelett in Frage kommen, kann beispielhaft anhand der Ergebnisse des Proteom-Scans diskutiert werden. Allerdings kann keine direkte Übertragung der Ergebnisse erfolgen, da die Versuche in verschiedenen Zelllinien erfolgten und diese eine stark unterschiedliche Signaltransduktion aufweisen können (siehe Kapitel 4.4 und 4.6).

5. Diskussion

Im Phospho-Akt-Substrat-Proteom Scan konnten unter anderem ein Phosphopeptid von Paxillin (Stelle 313/316) und eines der Kinase ROCK1 (Stelle S1333/1336) als SC-79-induziert heraufreguliert identifiziert werden. Die Recherchen in der PhosphoSitePlus®-Datenbank [118] zeigten, dass die Auswirkung einer S313/316-Phosphorylierung auf die Funktion von Paxillin bisher nicht untersucht wurde. Die Paxillin-Phosphorylierungen an mehreren Serin- und Tyrosinresten dienen als eine Anlagerungsstelle für die Rekrutierung von Signamolekülen zu fokalen Adhäsionen [147]. Daher sollte in Folgestudien die Relevanz der Phosphorylierung an S313/316 für die Funktion von Paxillin untersucht werden. Für die Phosphorylierung von ROCK1 an S1333/1336 zeigte die Datenbankrecherche in der PhosphoSitePlus®-Datenbank, dass diese Phosphorylierung zur Aktivierung des Proteins führt. Inwiefern diese beiden Proteine nun mit der Regulation des Aktin-Zytoskeletts in Karzinomzellen verknüpft sind zeigen verschiedene Studien auf. In Blasenkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes Paxillin mit der FAK ko-lokalisiert und hier vermutlich durch die Erhöhung des *Turnovers* von fokalen Adhäsionen die Migration und Invasion fördert [148]. In Brustkarzinomzelllinien konnte eine Reduktion in der Stressfaserbildung und der Ausbildung von fokalen Adhäsionen nach ROCK1-Inhibition beobachtet werden [149]. Die Inhibition von ROCK1 führte in einer Vielzahl an Zelllinien aus verschiedenen Tumorentitäten außerdem zu einer reduzierten Migration [150]. Somit sollten diese Proteine und die weiteren im Phospho-Akt-Proteom-Scan identifizierten putativen Akt3-Substrate in Folgestudien auf deren Validität als Akt3-spezifisches Substrat überprüft und anschließend deren Rolle in der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts analysiert werden. Dies stellt somit ein attraktives Folgeprojekt zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Akt-regulierten Aktin-Reorganisation dar.

6. Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010 (9). Berlin.
2. Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (2015) Krebs in Deutschland 2011/2012 (10). Berlin.
3. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5): 646–674.
4. Singh M, Yelle N, Venugopal C, Singh SK (2017) EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacology & therapeutics*.
5. Thiery JP, Acloque H, Huang, Ruby Y J, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139 (5): 871–890.
6. Hanna S, El-Sibai M (2013) Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cellular signalling* 25 (10): 1955–1961.
7. Ridley AJ (2011) Life at the leading edge. *Cell* 145 (7): 1012–1022.
8. Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112 (4): 453–465.
9. Sadok A, Marshall CJ (2014) Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases* 5: e29710.
10. Raftopoulou M, Hall A (2004) Cell migration. Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology* 265 (1): 23–32.
11. Jiang P, Enomoto A, Takahashi M (2009) Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton. *Cancer letters* 284 (2): 122–130.
12. Sever R, Brugge JS (2015) Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5 (4).
13. Kano Y, Cook JD, Lee JE, Ohh M (2016) New structural and functional insight into the regulation of Ras. *Seminars in cell & developmental biology* 58: 70–78.
14. Logsdon CD, Lu W (2016) The Significance of Ras Activity in Pancreatic Cancer Initiation. *International journal of biological sciences* 12 (3): 338–346.
15. Castellano E, Downward J (2011) RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & cancer* 2 (3): 261–274.
16. Mundi PS, Sachdev J, McCourt C, Kalinsky K (2016) AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *British journal of clinical pharmacology* 82 (4): 943–956.
17. Prior IA, Lewis PD, Mattos C (2012) A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer research* 72 (10): 2457–2467.
18. Jinesh GG, Sambandam V, Vijayaraghavan S, Balaji K, Mukherjee S (2017) Molecular genetics and cellular events of K-Ras-driven tumorigenesis. *Oncogene*.
19. Campbell PM, Der CJ (2004) Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Seminars in cancer biology* 14 (2): 105–114.
20. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ (2005) The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science* 118 (Pt 5): 843–846.
21. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F (2017) RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* 170 (1): 17–33.
22. Fitzgerald TL, Lertpiriyapong K, Cocco L, Martelli AM, Libra M et al. Roles of EGFR and KRAS and their Downstream Signaling Pathways in Pancreatic Cancer and Pancreatic Cancer Stem Cells. *Advances in Biological Regulation*. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212492615300063>.
23. Mann KM, Ying H, Juan J, Jenkins NA, Copeland NG (2016) KRAS-related proteins in pancreatic cancer. *Pharmacology & therapeutics* 168: 29–42.

6. Literaturverzeichnis

24. Fensterer H, Giehl K, Buchholz M, Ellenrieder V, Buck A et al. (2004) Expression profiling of the influence of RAS mutants on the TGF β 1-induced phenotype of the pancreatic cancer cell line PANC-1. *Genes, chromosomes & cancer* 39 (3): 224–235.
25. Dreissigacker U, Mueller MS, Unger M, Siegert P, Genze F et al. (2006) Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. *Cellular signalling* 18 (8): 1156–1168.
26. Schreiber SC, Giehl K, Kastilan C, Hasel C, Mühlenhoff M et al. (2008) Polysialylated NCAM represses E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* 134 (5): 1555–1566.
27. Padavano J, Henkhaus RS, Chen H, Skovan BA, Cui H et al. (2015) Mutant K-RAS Promotes Invasion and Metastasis in Pancreatic Cancer Through GTPase Signaling Pathways. *Cancer growth and metastasis* 8 (Suppl 1): 95–113.
28. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ (2014) Drugging the undruggable RAS: Mission possible. *Nature reviews. Drug discovery* 13 (11): 828–851.
29. Zeitouni D, Pylayeva-Gupta Y, Der CJ, Bryant KL (2016) KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers* 8 (4).
30. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch A-M et al. (2016) Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 531 (7592): 47–52.
31. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC-H, Leary RJ et al. (2008) Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, N.Y.)* 321 (5897): 1801–1806.
32. Unger Monika (2006) Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) auf die Signaltransduktion und die Migration von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm.
33. Castellano E, Sheridan C, Thin MZ, Nye E, Spencer-Dene B et al. (2013) Requirement for interaction of PI3-kinase p110 α with RAS in lung tumor maintenance. *Cancer cell* 24 (5): 617–630.
34. Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L (2004) A Portrait of AKT kinases. *Cancer Biology & Therapy* (3): 268–275.
35. Masure S, Haefner B, Wesselink JJ, Hoefnagel E, Mortier E et al. (1999) Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3. *European journal of biochemistry* 265 (1): 353–360.
36. Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *The Biochemical journal* 346 Pt 3: 561–576.
37. Yang Z-Z, Tschopp O, Hemmings-Mieszcak M, Feng J, Brodbeck D et al. (2003) Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *The Journal of biological chemistry* 278 (34): 32124–32131.
38. Fortier A-M, Asselin E, Cadrin M (2011) Functional specificity of Akt isoforms in cancer progression. *Biomolecular concepts* 2 (1-2): 1–11.
39. Ruggeri BA, Huang L, Wood M, Cheng JQ, Testa JR (1998) Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Molecular carcinogenesis* 21 (2): 81–86.
40. Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA et al. (1996) Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (8): 3636–3641.
41. Liang J-W, Shi Z-Z, Shen T-Y, Che X, Wang Z et al. (2014) Identification of genomic alterations in pancreatic cancer using array-based comparative genomic hybridization. *PLoS one* 9 (12): e114616.

6. Literaturverzeichnis

42. Miwa W, Yasuda J, Murakami Y, Yashima K, Sugano K et al. (1996) Isolation of DNA sequences amplified at chromosome 19q13.1-q13.2 including the AKT2 locus in human pancreatic cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 225 (3): 968–974.
43. Nitsche C, Edderkaoui M, Moore RM, Eibl G, Kasahara N et al. (2012) The phosphatase PHLPP1 regulates Akt2, promotes pancreatic cancer cell death, and inhibits tumor formation. *Gastroenterology* 142 (2): 377-87.e1-5.
44. Grabinski N, Möllmann K, Milde-Langosch K, Müller V, Schumacher U et al. (2014) AKT3 regulates ErbB2, ErbB3 and estrogen receptor α expression and contributes to endocrine therapy resistance of ErbB2(+) breast tumor cells from Balb-neuT mice. *Cellular signalling* 26 (5): 1021–1029.
45. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ et al. (2004) Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer research* 64 (19): 7002–7010.
46. Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W et al. (1999) Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *The Journal of biological chemistry* 274 (31): 21528–21532.
47. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM (2011) Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling* 23 (10): 1515–1527.
48. Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews. Genetics* 7 (8): 606–619.
49. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL et al. (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448 (7152): 439–444.
50. Manning BD, Toker A (2017) AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169 (3): 381–405.
51. Calleja V, Alcor D, Laguerre M, Park J, Vojnovic B et al. (2007) Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS biology* 5 (4): e95.
52. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N et al. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* 15 (23): 6541–6551.
53. Bozusic L, Hemmings BA (2009) PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Current opinion in cell biology* 21 (2): 256–261.
54. Yang J, Cron P, Thompson V, Good VM, Hess D et al. (2002) Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Molecular cell* 9 (6): 1227–1240.
55. Gonzalez E, McGraw TE (2009) The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (16): 2502–2508.
56. Berwick DC, Hers I, Heesom KJ, Moule SK, Tavaré JM (2002) The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 277 (37): 33895–33900.
57. Xue G, Hemmings BA (2013) PKB/Akt-dependent regulation of cell motility. *Journal of the National Cancer Institute* 105 (6): 393–404.
58. Fenton TR, Gout IT (2011) Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43 (1): 47–59.
59. Shi Y, Yan H, Frost P, Gera J, Lichtenstein A (2005) Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Molecular Cancer Therapeutics* 4 (10): 1533–1540.

6. Literaturverzeichnis

60. O'Reilly KE, Rojo F, She Q-B, Solit D, Mills GB et al. (2006) mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer research* 66 (3): 1500–1508.
61. Mayo LD, Donner DB (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (20): 11598–11603.
62. Manfredi JJ (2010) The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes & development* 24 (15): 1580–1589.
63. Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S et al. (2005) Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Molecular cell* 20 (4): 539–550.
64. Coomans de Brachene A, Demoulin J-B (2016) FOXO transcription factors in cancer development and therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73 (6): 1159–1172.
65. Rozengurt E, Soares HP, Sinnet-Smith J (2014) Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (11): 2477–2488.
66. Nguyen LK, Kholodenko BN (2016) Feedback regulation in cell signalling: Lessons for cancer therapeutics. *Seminars in cell & developmental biology* 50: 85–94.
67. Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O et al. (2011) AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer cell* 19 (1): 58–71.
68. Turke AB, Song Y, Costa C, Cook R, Arteaga CL et al. (2012) MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors. *Cancer research* 72 (13): 3228–3237.
69. Toulany M, Iida M, Keinath S, Iyi FF, Mueck K et al. (2016) Dual targeting of PI3K and MEK enhances the radiation response of K-RAS mutated non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7 (28): 43746–43761.
70. Jiang Z-B, Huang J, Xie C, Li X, Liu L et al. (2016) Combined use of PI3K and MEK inhibitors synergistically inhibits lung cancer with EGFR and KRAS mutations. *Oncology reports* 36 (1): 365–375.
71. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K et al. (2001) Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes & development* 15 (17): 2203–2208.
72. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ (2001) Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *The Journal of biological chemistry* 276 (42): 38349–38352.
73. Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL et al. (2003) Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *The Journal of clinical investigation* 112 (2): 197–208.
74. Tschopp O, Yang Z-Z, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczak M et al. (2005) Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development (Cambridge, England)* 132 (13): 2943–2954.
75. Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M et al. (2005) Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Molecular and Cellular Biology* 25 (5): 1869–1878.
76. Santi SA, Lee H (2010) The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *American journal of physiology. Cell physiology* 298 (3): C580-91.

6. Literaturverzeichnis

77. Liu H, Radisky DC, Nelson CM, Zhang H, Fata JE et al. (2006) Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (11): 4134–4139.
78. Chin YR, Toker A (2010) The actin-bundling protein palladin is an Akt1-specific substrate that regulates breast cancer cell migration. *Molecular cell* 38 (3): 333–344.
79. Rao G, Pierobon M, Kim I-K, Hsu W-H, Deng J et al. (2017) Inhibition of AKT1 signaling promotes invasion and metastasis of non-small cell lung cancer cells with K-RAS or EGFR mutations. *Scientific reports* 7 (1): 7066.
80. Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P et al. (2005) Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology* 171 (6): 1023–1034.
81. Zhou G-L, Tucker DF, Bae SS, Bhatheja K, Birnbaum MJ et al. (2006) Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration. *The Journal of biological chemistry* 281 (47): 36443–36453.
82. Meng J, Dai B, Fang B, Bekele BN, Bornmann WG et al. (2010) Combination treatment with MEK and AKT inhibitors is more effective than each drug alone in human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *PloS one* 5 (11): e14124.
83. Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T et al. (2005) Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Developmental cell* 9 (3): 389–402.
84. Meng Q, Xia C, Fang J, Rojanasakul Y, Jiang B-H (2006) Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. *Cellular signalling* 18 (12): 2262–2271.
85. Ju X, Katiyar S, Wang C, Liu M, Jiao X et al. (2007) Akt1 governs breast cancer progression in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (18): 7438–7443.
86. Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinavar FF, Bray MR, Snow BE et al. (2003) Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer research* 63 (1): 196–206.
87. Dillon RL, Muller WJ (2010) Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer research* 70 (11): 4260–4264.
88. Chin YR, Toker A (2010) Akt2 regulates expression of the actin-bundling protein palladin. *FEBS letters* 584 (23): 4769–4774.
89. Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare DA, Xiao GH, Testa JR (2001) AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer research* 61 (2): 589–593.
90. Agarwal E, Brattain MG, Chowdhury S (2013) Cell survival and metastasis regulation by Akt signaling in colorectal cancer. *Cellular signalling* 25 (8): 1711–1719.
91. XH Shi, ZY Liang, XY Ren, TH Liu (2009) Combined silencing of K-ras and Akt2 oncogenes achieves synergistic effects in inhibiting pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer gene therapy* (16): 227–236.
92. Linnerth-Petrik NM, Santry LA, Petrik JJ, Wootton SK (2014) Opposing functions of Akt isoforms in lung tumor initiation and progression. *PloS one* 9 (4): e94595.
93. Attoub S, Arafat K, Hammadi NK, Mester J, Gaben A-M (2015) Akt2 knock-down reveals its contribution to human lung cancer cell proliferation, growth, motility, invasion and endothelial cell tube formation. *Scientific reports* 5: 12759.
94. Bulj Z, Duchi S, Bevilacqua A, Gherardi A, Dozza B et al. (2013) Protein kinase B/AKT isoform 2 drives migration of human mesenchymal stem cells. *International journal of oncology* 42 (1): 118–126.

6. Literaturverzeichnis

95. Madhunapantula SV, Robertson GP (2017) Targeting protein kinase-b3 (akt3) signaling in melanoma. *Expert opinion on therapeutic targets*: 1–18.
96. Chin YR, Yoshida T, Marusyk A, Beck AH, Polyak K et al. (2014) Targeting Akt3 signaling in triple-negative breast cancer. *Cancer research* 74 (3): 964–973.
97. Grottke A, Ewald F, Lange T, Nörz D, Herzberger C et al. (2016) Downregulation of AKT3 Increases Migration and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Cells by Upregulating S100A4. *PloS one* 11 (1): e0146370.
98. Kim M, Kim YY, Jee HJ, Bae SS, Jeong NY et al. (2016) Akt3 knockdown induces mitochondrial dysfunction in human cancer cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 48 (5): 447–453.
99. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680–685.
100. Jo H, Mondal S, Tan D, Nagata E, Takizawa S et al. (2012) Small molecule-induced cytosolic activation of protein kinase Akt rescues ischemia-elicited neuronal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (26): 10581–10586.
101. Grabinski N, Bartkowiak K, Grupp K, Brandt B, Pantel K et al. (2011) Distinct functional roles of Akt isoforms for proliferation, survival, migration and EGF-mediated signalling in lung cancer derived disseminated tumor cells. *Cellular signalling* 23 (12): 1952–1960.
102. Scholtalbers J, Boegel S, Bukur T, Byl M, Goerges S et al. (2015) TCLP. An online cancer cell line catalogue integrating HLA type, predicted neo-epitopes, virus and gene expression. *Genome medicine* 7: 118.
103. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM et al. (2018) COSMIC. The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic acids research*.
104. Valenzuela DM, Groffen J (1986) Four human carcinoma cell lines with novel mutations in position 12 of c-K-ras oncogene. *Nucleic acids research* 14 (2): 843–852.
105. Ikediobi ON, Davies H, Bignell G, Edkins S, Stevens C et al. (2006) Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (11): 2606–2612.
106. Aoki K, Yoshida T, Matsumoto N, Ide H, Sugimura T et al. (1997) Suppression of Ki-ras p21 levels leading to growth inhibition of pancreatic cancer cell lines with Ki-ras mutation but not those without Ki-ras mutation. *Molecular carcinogenesis* 20 (2): 251–258.
107. Giehl K, Skripczynski B, Mansard A, Menke A, Gierschik P (2000) Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras. Implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene* 19 (25): 2930–2942.
108. Kalthoff H, Schmiegel W, Roeder C, Kasche D, Schmidt A et al. (1993) p53 and K-RAS alterations in pancreatic epithelial cell lesions. *Oncogene* 8 (2): 289–298.
109. Ouyang H, Mou L-j, Luk C, Liu N, Karaskova J et al. (2000) Immortal Human Pancreatic Duct Epithelial Cell Lines with Near Normal Genotype and Phenotype. *The American journal of pathology* 157 (5): 1623–1631.
110. Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, Real FX, Perucho M (1994) Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *International journal of cancer* 58 (2): 185–191.
111. Zhou H, Huang S (2011) Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Current protein & peptide science* 12 (1): 30–42.
112. Chen B, Tan Z, Gao J, Wu W, Liu L et al. (2015) Hyperphosphorylation of ribosomal protein S6 predicts unfavorable clinical survival in non-small cell lung cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 34: 126.

6. Literaturverzeichnis

113. Chin YR, Toker A (2014) Akt isoform-specific signaling in breast cancer. *Cell Adhesion & Migration* 5 (3): 211–214.
114. Muller PAJ, Vousden KH (2014) Mutant p53 in cancer. New functions and therapeutic opportunities. *Cancer cell* 25 (3): 304–317.
115. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F et al. (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science (New York, N.Y.)* 303 (5659): 844–848.
116. Moran DM, Maki CG (2010) Nutlin-3a induces cytoskeletal rearrangement and inhibits the migration and invasion capacity of p53 wild-type cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 9 (4): 895–905.
117. Gudkov AV, Komarova EA (2005) Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications* 331 (3): 726–736.
118. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V et al. (2015) PhosphoSitePlus, 2014. Mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic acids research* 43 (Database issue): D512–20.
119. Kent, Oliver A., Sandí María-José, Burston, Helen E., Brown, Kevin R. and Rottapel, Robert (2017) An oncogenic KRAS transcription program activates the RHOGEF ARHGEF2 to mediate transformed phenotypes in pancreatic cancer. *Oncotarget* 8 (3): 4484–4500.
120. Lin H-P, Lin C-Y, Huo C, Jan Y-J, Tseng J-C et al. (2015) AKT3 promotes prostate cancer proliferation cells through regulation of Akt, B-Raf, and TSC1/TSC2. *Oncotarget* 6 (29): 27097–27112.
121. Watson KL, Moorehead RA (2013) Loss of Akt1 or Akt2 delays mammary tumor onset and suppresses tumor growth rate in MTB-IGFIR transgenic mice. *BMC cancer* 13: 375.
122. Noske A, Kaszubiak A, Weichert W, Sers C, Niesporek S et al. (2007) Specific inhibition of AKT2 by RNA interference results in reduction of ovarian cancer cell proliferation: increased expression of AKT in advanced ovarian cancer. *Cancer letters* 246 (1-2): 190–200.
123. Zeisberg M, Neilson EG (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation* 119 (6): 1429–1437.
124. Gonzalez DM, Medici D (2014) Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science signaling* 7 (344): re8.
125. Liu C-Y, Lin H-H, Tang M-J, Wang Y-K (2015) Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* 6 (18): 15966–15983.
126. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS et al. (2007) RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *The Journal of biological chemistry* 282 (19): 14056–14064.
127. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J (2004) Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (37): 13489–13494.
128. Ewald F, Grabinski N, Grottke A, Windhorst S, Nörz D et al. (2013) Combined targeting of AKT and mTOR using MK-2206 and RAD001 is synergistic in the treatment of cholangiocarcinoma. *International journal of cancer* 133 (9): 2065–2076.
129. Ewald F, Nörz D, Grottke A, Bach J, Herzberger C et al. (2015) Vertical Targeting of AKT and mTOR as Well as Dual Targeting of AKT and MEK Signaling Is Synergistic in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cancer* 6 (12): 1195–1205.
130. Procaccia S, Ordan M, Cohen I, Bendetz-Nezer S, Seger R (2017) Direct binding of MEK1 and MEK2 to AKT induces Foxo1 phosphorylation, cellular migration and metastasis. *Scientific reports* 7: 43078.

6. Literaturverzeichnis

131. Soares HP, Ming M, Mellon M, Young SH, Han L et al. (2015) Dual PI3K/mTOR Inhibitors Induce Rapid Overactivation of the MEK/ERK Pathway in Human Pancreatic Cancer Cells through Suppression of mTORC2. *Molecular Cancer Therapeutics* 14 (4): 1014–1023.
132. Jiang ZY, Zhou QL, Coleman KA, Chouinard M, Boese Q et al. (2003) Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (13): 7569–7574.
133. Gonzalez E, McGraw TE (2009) Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (17): 7004–7009.
134. Eves R, Oldham R, Jia L, Mak AS (2015) The roles of akt isoforms in the regulation of podosome formation in fibroblasts and extracellular matrix invasion. *Cancers* 7 (1): 96–111.
135. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH et al. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (New York, N.Y.)* 302 (5651): 1704–1709.
136. Massihnia D, Avan A, Funel N, Maftouh M, van Krieken A et al. (2017) Phospho-Akt overexpression is prognostic and can be used to tailor the synergistic interaction of Akt inhibitors with gemcitabine in pancreatic cancer. *Journal of hematology & oncology* 10 (1): 9.
137. Kim S-H, Jang YH, Chau GC, Pyo S, Um SH (2013) Prognostic significance and function of phosphorylated ribosomal protein S6 in esophageal squamous cell carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 26 (3): 327–335.
138. Virtakoivu R, Pellinen T, Rantala JK, Perälä M, Ivaska J (2012) Distinct roles of AKT isoforms in regulating β 1-integrin activity, migration, and invasion in prostate cancer. *Molecular biology of the Cell* 23 (17): 3357–3369.
139. Sui X, Shin S, Zhang R, Firozi PF, Yang L et al. (2009) Hdm2 is regulated by K-Ras and mediates p53-independent functions in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 28 (5): 709–720.
140. Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, Vassilev LT, Singer S, Schwartz GK. (2007) Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene* (26): 3473–3481.
141. Saha T, Kar RK, Sa G (2014) Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. *Progress in biophysics and molecular biology*.
142. Komarov PG (1999) A Chemical Inhibitor of p53 That Protects Mice from the Side Effects of Cancer Therapy. *Science* 285 (5434): 1733–1737.
143. Murphy, Patrick J M, Galigniana MD, Morishima Y, Harrell JM, Kwok, Roland P S et al. (2004) Pifithrin-alpha inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *The Journal of biological chemistry* 279 (29): 30195–30201.
144. Muller PAJ, Trinidad AG, Timpson P, Morton JP, Zanivan S et al. (2013) Mutant p53 enhances MET trafficking and signalling to drive cell scattering and invasion. *Oncogene* 32 (10): 1252–1265.
145. Vandermoere F, El Yazidi-Belkoura I, Demont Y, Slomianny C, Antol J et al. (2007) Proteomics exploration reveals that actin is a signaling target of the kinase Akt. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6 (1): 114–124.
146. Riggio M, Perrone MC, Polo ML, Rodriguez MJ, May M et al. (2017) AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Scientific reports* 7: 44244.
147. Maziveyi M, Alahari SK (2017) Cell matrix adhesions in cancer. The proteins that form the glue. *Oncotarget* 8 (29): 48471–48487.

6. Literaturverzeichnis

148. Metalli D, Lovat F, Tripodi F, Genua M, Xu S-Q et al. (2010) The insulin-like growth factor receptor I promotes motility and invasion of bladder cancer cells through Akt- and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of paxillin. *The American journal of pathology* 176 (6): 2997–3006.
149. Liu S, Goldstein RH, Scepansky EM, Rosenblatt M (2009) Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone. *Cancer research* 69 (22): 8742–8751.
150. Wei L, Surma M, Shi S, Lambert-Cheatham N, Shi J (2016) Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 64 (4): 259–278.

7. 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. 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

8. Danksagung

Mit diesen Zeilen möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die die Anfertigung meiner Dissertation ermöglicht haben. Vor allem möchte ich mich bedanken bei

- meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dammann, dafür dass er meine Arbeit betreut hat und die Geduld mitbrachte, diese immer mit einem offenen Ohr für Probleme und deren Lösungen bis zum Ende zu begleiten.
- meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. Giehl für die Möglichkeit meine Dissertation in der AG anzufertigen, für ihre gute Betreuung und die hilfreichen Diskussionen sowie die stete Unterstützung in der Planung der Versuche und Vollendung dieser Arbeit.
- meinen lieben Kollegen. Ihr wart einfach ein tolles Team, habt stets für gute Laune gesorgt, hilfreich zur Seite gestanden und mich damit immer toll unterstützt. Ein herzliches Dankeschön an jeden Einzelnen von euch!
- meiner ganzen Familie und meiner besten Freundin, die während der Zeit meiner Promotion stets für mich da waren, meine Sorgen und Probleme teilten und mich in den schönen, aber auch den schwierigen Zeiten immer unterstützten. Damit habt ihr mir die Kraft und das Durchhaltevermögen gegeben, diese Arbeit zu vollenden und die Grundlage für meinen weiteren Weg geebnet. Vielen Dank dafür, ihr Lieben!

9. Konferenzbeiträge & Auszeichnungen

9.1 Konferenzbeiträge

Lammert A. and Giehl K. (2014): *The role of Akt 1/2 in the regulation of migration and invasion of lung- and pancreatic carcinoma cells with oncogenic K-Ras*. 7. Nachwuchswissenschaftler-Meeting "Young Scientists meet experience" veranstaltet durch die GBM-Studiengruppe „Biochemische Pharmakologie und Toxikologie“, Günzburg, September 2014 (Poster AL).

Lammert A., Bier J. Giehl K. (2015): *The role of the PI3-K/Akt pathway in the regulation of migration of lung and pancreatic carcinoma cell lines with oncogenic K-Ras*. 19th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): *Signal Transduction, Mediators and Genes*, Weimar, November 2015 (Poster AL).

Lammert A., Bier J., Jücker M., Giehl K. (2016): *Akt isoforms in controlling cell migration of lung and pancreatic adenocarcinoma cells*. 20th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): *Signal Transduction, Mediators and Genes*, Weimar, November 2016 (Vortrag AL).

Lammert A., Bier J., Jücker M. and Giehl K. (2016): *Cellular motility is regulated by the Akt family of protein kinases in pancreatic and lung cancer cell lines*. 8. Nachwuchswissenschaftler-Meeting "Young Scientists meet experience" veranstaltet durch die GBM-Studiengruppe „Biochemische Pharmakologie und Toxikologie“, Günzburg, Dezember 2016 (Vortrag AL).

Lammert A., Bier J., Jücker M., Giehl K. (2017): *Regulating cell migration of lung and pancreatic cancer cells by Akt kinases*. 21th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): *Signal Transduction, Mediators and Genes*, Weimar, November 2017 (Poster AL).

9.2 Auszeichnungen

CST PTM-Scan Award von New England Biolabs/Cell Signaling Technology im Wert von 9.000€ – erhalten auf dem 20th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): *Signal Transduction, Mediators and Genes*, Weimar, November 2016.

Posterpreis der STS (4. Platz) – erhalten auf dem 21th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): *Signal Transduction, Mediators and Genes*, Weimar, November 2017.

10. Anhang

10.1 Ergänzende Abbildungen

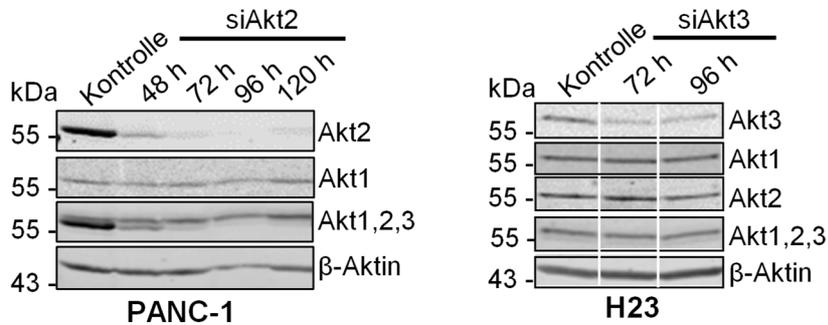


Abb. 10-1. Zeitreihen nach siRNA-Transfektion. Immunblot-Analysen aus RIPA-Zelllysaten von PANC-1 und H23 Zellen. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert und anschließend mit 50 nM *SmartPool* siRNA gegen Akt2 oder Akt3 transfiziert. Untransfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten in RIPA-Puffer lysiert und je 50 µg Lysat im Immunblotverfahren analysiert. Die Detektion der Akt-Isoformen erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Akt1 (2H10), Akt2 (D6G4), Akt3 (L47B9) und einem Akt-Antikörper, der alle Akt-Isoformen (Akt1,2,3-Antikörper) erkennt. Der Nachweis von β-Aktin diente jeweils als Ladekontrolle. Die Nachweise erfolgten mittels Fluoreszenz-Detektion.

10. Anhang

10.2 Ergänzende Tabellen

Tabelle 10-1. Einfluss von AktVIII, LY294002 und Rapamycin auf die Phosphorylierung von Akt, S6 und ERK1/2. Quantifizierung der relativen Signalintensität der Banden von Immunblots mit Zelllysaten von PANC-1, COLO 357, H23 und COLO-699 Zellen. Die Zellen wurden 15 h in DMEM ohne Zusätze mit AktVIII, LY294002 (beide 10 μ M), Rapamycin (100 nM) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt, in RIPA-Puffer lysiert und 50 μ g Lysat im Immunblotverfahren mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Banden wurden mittels Densitometrie vermessen. Zur Ermittlung der relativen Phosphorylierung wurde das Verhältnis von phosphoryliertem Protein zum nicht-phosphorylierten Protein gebildet. Die relative Signalintensität wurde in Relation zur DMSO-Behandlung (= 100 %) berechnet und ist als Mittelwert (MW) \pm SD angegeben (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ im Vergleich zu DMSO; T-Test). Bei zwei Bestimmungen sind die Einzelwerte der Messungen angegeben. n = Anzahl der Bestimmungen.

	pAkt			pS6			pERK1/2		
	MW (%)	SD	n	MW (%)	SD	n	MW (%)	SD	n
AktVIII									
PANC-1	23.4**	\pm 7.8	3	24.8**	\pm 9.1	3	160.4**	\pm 17.9	4
H23	17.9***	\pm 1.0	3	63.7*	\pm 12.6	3	124.4	\pm 17.9	3
COLO-699	27.3**	\pm 11.2	3	30.0; 40.6	-	2	175.0; 187.7	-	2
COLO 357	1.4***	\pm 1.6	4	74.9; 78.2	-	2	164.6	\pm 62.1	3
LY294002									
PANC-1	26.6; 19.3	-	2	25.6***	\pm 11.4	4	130.1	\pm 40.8	3
H23	25.3**	\pm 6.6	3	15.1***	\pm 2.9	3	120.4**	\pm 3.1	3
COLO-699	54.5; 34.2	-	2	8.7; 16.4	-	2	318.6; 561.1	-	2
COLO 357	11.4***	\pm 0.9	4	87.4	\pm 65.1	3	96.3	\pm 28.0	4
Rapamycin									
PANC-1	34.3; 72.3	-	2	12.6**	\pm 6.0	3	134.7	\pm 28.9	3
H23	213.3	\pm 85.5	3	8.8***	\pm 1.5	3	124.4*	\pm 8.4	3
COLO-699	191.0*	\pm 50.6	4	15.1**	\pm 4.9	3	162.8; 226.0	-	2
COLO 357	91.8	\pm 18.4	3	51.2; 65.0	-	2	106.9	\pm 34.1	5

10. Anhang

Tabelle 10-2. Einfluss von SC-79 auf die Zellmigration. Für *Wounding-Assays* wurde in konfluent gewachsene Zellen (PANC-1, H23 und COLO-699) mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Die Zellen wurden in Medium mit 1 % (PANC-1) oder 5 % FCS (H23, COLO-699) kultiviert und mit SC-79 (1 µM; 10 µM) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. Der relative Wundverschluss wurde anhand von Messungen der Spaltbreiten zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert ± SEM angegeben. n = Anzahl der Bestimmungen.

Zelllinie	Behandlung	Wundverschluss nach 24 h (%)			Wundverschluss nach 48 h (%)		
		MW	SEM	n	MW	SEM	n
PANC-1							
	DMSO (0.1 %)	49.8	± 3.2	3	69.5	± 6.0	3
	SC-79 (1 µM)	60.2	± 4.7	3	83.6	± 12.4	3
	SC-79 (10 µM)	48.4	± 5.2	3	70.2	± 2.8	3
COLO-699							
	DMSO (0.1 %)	49.1	± 8.7	5	71.8	± 10.9	5
	SC-79 (1 µM)	52.0	± 10.2	5	74.0	± 13.5	5
	SC-79 (10 µM)	50.3	± 9.0	5	73.1	± 10.3	5
H23							
	DMSO (0.1 %)	49.5	± 6.9	3	67.7	± 7.0	3
	SC-79 (1 µM)	63.6	± 8.1	3	76.9	± 3.0	3
	SC-79 (10 µM)	47.1	± 4.0	3	57.4	± 2.7	3

Tabelle 10-3. Einfluss von AktVIII auf die Zellmigration. Für *Wounding-Assays* wurde in konfluent gewachsene Zellen (PANC-1, H23 und COLO-699) mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Die Zellen wurden in Medium mit 1 % (PANC-1) oder 5 % FCS (H23, COLO-699) kultiviert und mit AktVIII (10 µM oder 5 µM für H23) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. Der relative Wundverschluss wurde anhand von Messungen der Spaltbreiten zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert ± SEM angegeben (*p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001 im Vergleich zu DMSO; T-Test). n = Anzahl der Bestimmungen.

Zelllinie	Behandlung	Wundverschluss nach 24 h (%)			Wundverschluss nach 48 h (%)		
		MW	SEM	n	MW	SEM	n
PANC-1							
	DMSO (0.1 %)	49.8	± 3.2	3	69.5	± 6.0	3
	AktVIII (10 µM)	32.4	± 14.2	3	40.9*	± 12.6	3
COLO-699							
	DMSO (0.1 %)	49.1	± 8.7	5	71.8	± 10.9	5
	AktVIII (10 µM)	29.2**	± 5.2	5	35.1***	± 9.1	5
H23							
	DMSO (0.1 %)	49.5	± 6.9	3	67.7	± 7.0	3
	AktVIII (5 µM)	46.8	± 3.2	3	61.7	± 4.2	3

10. Anhang

Tabelle 10-4. Einfluss von Rapamycin auf die Zellmigration. Für *Wounding-Assays* wurde in konfluent gewachsene Zellen (H23 und COLO-699) mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Die Zellen wurden in Medium mit 5 % FCS kultiviert und mit Rapamycin (100 nM) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt. Der relative Wundverschluss wurde anhand von Messungen der Spaltbreiten zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert \pm SEM angegeben (* $p \leq 0.05$ im Vergleich zu DMSO; T-Test). n = Anzahl der Bestimmungen.

Zelllinie	Behandlung	Wundverschluss nach 24 h (%)			Wundverschluss nach 48 h (%)		
		MW	SEM	n	MW	SEM	n
COLO-699							
	DMSO (0.1 %)	52.2	± 4.8	3	76.2	± 7.7	3
	Rapamycin (100 nM)	48.0	± 9.2	3	64.9	± 9.8	3
H23							
	DMSO (0.1 %)	49.5	± 6.9	3	67.7	± 7.0	3
	Rapamycin (100 nM)	61.3	± 2.3	3	90.2*	± 6.6	3

Tabelle 10-5 und 10-6. Einfluss von Nutlin-3 und Pifithrin- α auf die Phosphorylierung von Akt, S6 und ERK1/2, sowie auf den p53- und MDM2-Gehalt. Quantifizierung der relativen Signalintensität der Banden von Immunblots mit Zelllysaten von PANC-1, H23 und COLO-699 Zellen. Die Zellen wurden 15 h in DMEM ohne Zusätze mit Nutlin-3 (10 μ M), Pifithrin- α (25 μ M) oder zur Kontrolle mit DMSO (0.1 %) behandelt, in RIPA-Puffer lysiert und 50 μ g Lysat im Immunblotverfahren mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Banden wurden mittels Densitometrie vermessen. Zur Ermittlung der relativen Phosphorylierung wurde das Verhältnis von phosphoryliertem Protein zum nicht-phosphorylierten Protein gebildet. Der p53- und MDM2-Gehalt ist relativ zur β -Aktin-Expression angegeben. Die relative Signalintensität wurde in Relation zur DMSO-Behandlung (= 100 %) gesetzt und ist als Mittelwert (MW) \pm SD angegeben. Bei zwei Bestimmungen sind die Einzelwerte angegeben (* $p \leq 0.05$ im Vergleich zu DMSO; T-Test). n = Anzahl der Bestimmungen, n. a. = nicht auswertbar.

	pAkt			pS6			pERK1/2		
	MW (%)	SD	n	MW (%)	SD	n	MW (%)	SD	n
Nutlin-3									
PANC-1	116.8	± 54.9	3	87.3	± 25.7	3	113.8	± 16.3	3
H23	109.2*	± 2.3	3	114.0	± 6.8	3	114.2	± 13.1	3
COLO-699	160.3	± 50.2	4	73.5*	± 5.6	3	147.1; 154.2	-	2
Pifithrin-α									
PANC-1	168.3	± 53.1	3	106.8	± 19.0	4	188.9*	± 40.0	4
H23	208.1*	± 43.1	3	65.9*	± 9.7	3	144.3*	± 11.7	3
COLO-699	428.9*	± 141.0	4	93.2	± 40.5	3	111.6; 98.7	-	2

	MDM2			p53		
	MW (%)	SD	n	MW (%)	SD	n
Nutlin-3						
PANC-1	n. a.	-	-	121.5	± 57.2	3
H23	286.6; 219.6	-	2	121.8	± 24.2	3
COLO-699	n. a.	-	-	115.7	± 18.3	3
Pifithrin-α						
PANC-1	n.a.	-	-	98.2	± 26.7	4
H23	123.1; 72.6	-	2	102.4	± 10.4	3
COLO-699	n. a.	-	-	88.1	± 8.1	3

10. Anhang

Tabelle 10-7. Einfluss von Nutlin-3 und Pifithrin- α auf die Zellmigration. Für *Wounding-Assays* wurde in konfluent gewachsene Zellen (PANC-1, H23 und COLO-699) mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Die Zellen wurden in Medium mit 1 % (PANC-1) oder 5 % FCS (H23, COLO-699) kultiviert und mit Nutlin-3 (10 μ M), Pifithrin- α (10 μ M oder 25 μ M für COLO-699) oder DMSO (0.1 %) behandelt. Der relative Wundverschluss wurde anhand von Messungen der Spaltbreiten zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert (MW) \pm SEM angegeben. Bei zwei Bestimmungen sind die Einzelwerte angegeben (* $p \leq 0.05$ im Vergleich zu DMSO; T-Test). n = Anzahl der Bestimmungen; n. a. = nicht auswertbar.

Zelllinie	Behandlung	Wundverschluss nach 24 h (%)			Wundverschluss nach 48 h (%)		
		MW	SEM	n	MW	SEM	n
PANC-1							
	DMSO (0.1 %)	53.8	± 7.9	5	68.0	± 12.1	5
	Nutlin-3 (10 μ M)	58.4	± 4.5	4	75.8	± 9.3	4
	Pifithrin- α (10 μ M)	56.9; 41.2	-	2	66.9; 51.6	-	2
COLO-699							
	DMSO (0.1 %)	54.1	± 5.5	4	77.1	± 6.6	4
	Nutlin-3 (10 μ M)	60.3	± 9.2	4	87.5	± 9.8	4
	Pifithrin- α (25 μ M)	44.4*	± 4.7	4	68.2	± 5.8	4
H23							
	DMSO (0.1 %)	49.5	± 6.9	3	67.7	± 7.0	3
	Nutlin-3 (10 μ M)	59.1	± 7.4	3	n. a.	-	3
	Pifithrin- α (10 μ M)	67.6*	± 1.4	3	n. a.	-	3

Tabelle 10-8. Einfluss von MEK-Inhibitoren auf die Zellmigration. Für *Wounding-Assays* wurde in konfluent gewachsene Zellen (PANC-1, H23 und COLO-699) mit einer Pipettenspitze eine Wunde gekratzt. Die Zellen wurden in Medium mit 1 % (PANC-1) oder 5 % FCS (H23, COLO-699) kultiviert und UO-126 (1 μ M; 10 μ M), PD98059 (25 μ M) oder DMSO (0.1 %) behandelt. Der relative Wundverschluss wurde anhand von Messungen der Spaltbreiten zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert (MW) \pm SEM angegeben. Bei zwei Bestimmungen sind die Einzelwerte angegeben. n = Anzahl der Bestimmungen; n. a. = nicht auswertbar.

Zelllinie	Behandlung	Wundverschluss nach 24 h (%)			Wundverschluss nach 48 h (%)		
		MW	SEM	n	MW	SEM	n
PANC-1							
	DMSO (0.1 %)	53.1	± 5.6	7	70.4	± 9.1	7
	UO-126 (10 μ M)	60.2	± 3.1	3	73.3	± 8.0	3
	UO-126 (1 μ M)	53.9	± 2.9	3	72.0	± 10.4	3
	PD98059 (25 μ M)	60.0	± 0.8	3	81.7; 69.4	-	2
COLO-699							
	DMSO (0.1 %)	48.5	± 7.2	7	69.8	± 7.4	7
	UO-126 (10 μ M)	53.3	± 9.1	5	75.4	± 8.9	5
	UO-126 (1 μ M)	57.3	± 15.2	3	78.5	± 13.4	3
	PD98059 (25 μ M)	46.5	± 4.4	3	63.0	± 5.8	3
H23							
	DMSO (0.1 %)	49.5	± 6.9	3	67.7	± 7.1	3
	UO-126 (1 μ M)	54.1	± 6.1	3	71.4	± 3.4	3
	UO-126 (10 μ M)	39.4	± 2.1	3	n. a.	-	3
	PD98059 (25 μ M)	40.0	± 0.9	3	61.4	± 8.8	3

10. Anhang

Tabelle 10-9. Einfluss einer Akt1-, Akt2- und Akt3-Depletion auf die Zellmigration. Für *Wounding-Assays* wurden Zellen (PANC-1, PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.1 und -4.4 sowie H23 und COLO-699) mit siRNA, wie in Kapitel 4.7.4 beschrieben, transfiziert und 54 h danach mit einer Pipettenspitze eine Wunde in die konfluent gewachsenen Zellen gekratzt. Die Zellen wurden in Medium mit 1 % FCS (PANC-1, PANC-1-Zellklone) oder 5 % FCS (COLO-699, H23) kultiviert. Die gewanderte Strecke pro Wundrand wurde anhand von Messungen der Spaltfläche zu den verschiedenen Zeitpunkten berechnet und ist als Mittelwert \pm SEM angegeben (* $p \leq 0.05$ im Vergleich zu siScrbld; T-Test). Bei zwei Bestimmungen sind die Einzelwerte angegeben. n = Anzahl der Bestimmungen.

Zelllinie	Behandlung	Strecke nach 24 h (μm)			Strecke nach 48 h (μm)		
		MW	SEM	n	MW	SEM	n
PANC-1							
	siScrbld (50 nM)	145.3	± 16.6	3	228.7	± 20.3	3
	siAkt1 (50 nM)	94.8*	± 14.8	3	166.6	± 32.7	3
	siAkt2 (50 nM)	137.4; 119.8	-	2	203.5; 217.6	-	2
	siAkt3 (50 nM)	124.9; 101.1	-	2	170.3; 219.8	-	2
PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.1							
	siScrbld (50 nM)	108.9	± 5.2	3	191.4	± 25.5	3
	siAkt1 (50 nM)	79.9*	± 7.4	3	144.2	± 24.6	3
	siAkt2 (50 nM)	78.2; 93.1	-	2	117.6; 169.6	-	2
	siAkt3 (50 nM)	90.0	± 11.0	3	160.0	± 33.4	3
PANC-1/EGFP-K-Ras(V12)-4.4							
	siScrbld (50 nM)	80.2	± 8.7	3	161.6	± 16.1	3
	siAkt1 (50 nM)	63.9; 73.4	-	2	116.3; 142.9	-	2
	siAkt2 (50 nM)	68.7; 71.8	-	2	122.2; 111.7	-	2
	siAkt3 (50 nM)	77.4	± 10.0	3	147.6	± 17.8	3
COLO-699							
	siScrbld (50 nM)	125.4	± 23.9	4	222.1	± 32.8	4
	siAkt1 (50 nM)	126.1	± 10.0	4	227.2	± 36.4	4
	siAkt2 (50 nM)	141.3	± 22.3	4	242.9	± 27.2	4
	siAkt3 (50 nM)	143.5	± 21.3	4	250.8	± 41.2	4
H23							
	siScrbld (50 nM)	141.7	± 9.7	3	233.5	± 46.1	3
	siAkt1 (50 nM)	115.8; 139.2	-	2	192.6; 237.9	-	2
	siAkt2 (50 nM)	165.3	± 33.4	3	262.7	± 59.6	3
	siAkt3 (50 nM)	121.0; 176.0	-	2	181.6; 281.2	-	2