

**Untersuchungen zur Rolle des Zellpolaritätsgens  
Crumbs 3 (CRB3) bei der Progression des humanen  
Mammakarzinoms**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
im Department Biologie  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Susann Schirmer**  
aus Lengefeld

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. Klaus Pantel  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Konrad Wiese  
Tag der Disputation: 28. August 2009

Hamburg, den 13. August 2009



Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

**Erster Gutachter: Prof. Dr. Klaus Pantel**

**Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Konrad Wiese**



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Das humane Mammakarzinom</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Die Klassifizierung invasiver Mammakarzinome .....	4
2.1.2	Tumorprogression und Metastasierung .....	5
2.1.3	Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) in der Tumorprogression.....	6
<b>2.2</b>	<b>Die epitheliale Zellpolariät</b> .....	<b>9</b>
2.2.1	Die apikobasalen Zellpolaritäts-Komplexe .....	10
<b>2.3</b>	<b>Die Familie der Crumbs (Crb) Proteine</b> .....	<b>13</b>
2.3.1	Die humanen Crumbs (CRB) Homologe.....	14
2.3.2	Crumbs3 (CRB3).....	15
<b>2.4</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>18</b>
3.1.1	Chemikalien .....	18
3.1.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	18
<b>3.2</b>	<b>Zellkulturmethoden</b> .....	<b>18</b>
3.2.1	Kulturmedien und -zusätze .....	18
3.2.2	Herkunft der Zelllinien .....	19
3.2.3	Kulturbedingungen .....	19
3.2.4	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen.....	20
3.2.5	Mycoplasmen-Test.....	21
3.2.6	Transfektion eukaryontischer Zellen mit kationischen Lipiden .....	21
3.2.7	Retroviraler Gentransfer .....	22
3.2.8	Tet-On Genexpressions-System .....	23
3.2.9	Bestimmung der Zellproliferationsrate .....	24
3.2.10	Fokus-Assay .....	24
3.2.11	Soft-Agar Assay .....	25
3.2.12	Implantation von Zellen in immundefiziente Mäuse .....	25
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.3.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> .....	26

3.3.2	Herstellung kompetenter Bakterien .....	27
3.3.3	Transformation von <i>E.coli</i> .....	27
3.3.4	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Miniprep) .....	28
3.3.5	Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Maxiprep) .....	28
3.3.6	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA .....	28
3.3.7	Restriktionsverdau.....	28
3.3.8	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA .....	29
3.3.9	Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren.....	29
3.3.10	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen.....	30
3.3.11	Ligation von DNA-Fragmenten .....	30
3.3.12	Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen .....	31
3.3.13	Isolierung von Gesamt-RNA.....	31
3.3.14	Erststrang-cDNA-Synthese .....	31
3.3.15	DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
3.3.16	Klonierung von PCR-Produkten.....	33
3.3.17	Zielgerichtete Mutagenese .....	34
3.3.18	Automatische DNA-Sequenzierung .....	35
3.3.19	Qualitative mRNA-Analyse durch Northern-Blot-Hybridisierung.....	35
3.3.20	Erstellung und Auswertung von Expressionsprofilen mittels Mikroarray- Technologie.....	39
3.3.21	Quantitative <i>Realtime</i> -PCR .....	40
<b>3.4</b>	<b>Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>42</b>
3.4.1	Herstellung polyklonaler Antiseren .....	42
3.4.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren.....	43
3.4.3	Western Blot Analyse von Proteinen .....	45
3.4.4	Immunpräzipitation von FLAG-Fusionsproteinen.....	51
3.4.5	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	52
3.4.6	Cdc42/Rac1/2/3-Aktivierungsassay .....	54
3.4.7	Tunikamycin-induzierte Inhibition der N-Glykosylierung.....	55
3.4.8	Inhibition der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation.....	56
3.4.9	Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen .....	56
3.4.10	Immunhistochemische Färbung von Paraffin-Schnitten und TMAs.....	57
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Transformierende Eigenschaften von CRB3.....</b>	<b>59</b>
4.1.1	Identifizierung von zwei CRB3-Transkriptvarianten .....	59
4.1.2	Herstellung von CRB3A- und CRB3B-Expressionsplasmiden .....	61

4.1.3	Stabile Transfektion von NIH3T3-Zellen mit isoformspezifischen FLAG-CRB3-Expressionsplasmiden .....	62
4.1.4	CRB3A induziert die morphologische Transformation von NIH3T3 Zellen .....	63
4.1.5	CRB3A und CRB3B vermitteln eine Steigerung der Teilungsaktivität in NIH3T3-Fibroblasten .....	64
4.1.6	CRB3A exprimierende NIH3T3-Zellen wachsen Substrat-unabhängig .....	65
4.1.7	NIH3T3/CRB3A-Zellen bilden Tumoren in immundefizienten Mäusen.....	66
<b>4.2</b>	<b>Die Signalkaskade der CRB3A-induzierten Transformation .....</b>	<b>68</b>
4.2.1	CRB3A ist intrazellulär lokalisiert in NIH3T3-Zellen .....	68
4.2.2	Das C-terminale ERLI-Motiv ist essenziell für die CRB3A-induzierte Transformation von NIH3T3-Zellen.....	69
4.2.3	Identifizierung von CRB3A-Bindungspartnern in NIH3T3-Zellen.....	72
4.2.4	Der CRB3A-Par6-Komplex rekrutiert die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1/2/3.....	73
<b>4.3</b>	<b>CRB3A führt zu Veränderungen im Genexpressionsmuster von NIH3T3-Zellen .....</b>	<b>75</b>
<b>4.4</b>	<b>Studien zur Expression von CRB3 an humanen Mammakarzinom-Zelllinien.....</b>	<b>78</b>
4.4.1	Herstellung von polyklonalen CRB3-Antikörpern .....	78
4.4.2	CRB3-Expression in humanen Mammakarzinom-Zelllinien .....	79
4.4.3	Die Expression von Zellpolaritäts- und Zelladhäsionsproteinen in Mammakarzinom-Zelllinien.....	82
<b>4.5</b>	<b>Untersuchung der CRB3A-Signalwege in MCF-7 Zellen.....</b>	<b>83</b>
4.5.1	Stabile Transfektion von MCF-7 Tet-On Zellen zur induzierbaren CRB3A-Expression .....	84
4.5.2	CRB3A ist intrazellulär lokalisiert in Mammakarzinom-Zelllinien .....	86
4.5.3	Identifizierung von CRB3A-Bindungspartnern in MCF-7 Zellen .....	87
4.5.4	Untersuchung der CRB3A-vermittelten Aktivierung von Cdc42 und Rac1/2/3 in MCF-7 Zellen.....	88
<b>4.6</b>	<b>Untersuchungen zur Expression des CRB3B-Proteins .....</b>	<b>90</b>
4.6.1	Untersuchungen zur Stabilität des CRB3B-Proteins .....	90
4.6.2	Mutationsstudien zur Untersuchung einer Ubiquitin-vermittelten Degradation des CRB3B-Proteins .....	91
<b>4.7</b>	<b>CRB3A-Expression in Mammakarzinomen und Normalgeweben.....</b>	<b>92</b>
<b>4.8</b>	<b>CRB3A-Expression in verschiedenen humanen Normalgeweben.....</b>	<b>95</b>
<b>4.9</b>	<b>CRB3A-Expression in verschiedenen humanen Tumoren .....</b>	<b>97</b>

---

<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>100</b>
<b>5.1</b>	<b>Transformierende Eigenschaften des CRB3-Gens .....</b>	<b>100</b>
<b>5.2</b>	<b>Mechanismen der CRB3A-induzierten Transformation in NIH3T3-Zellen.....</b>	<b>101</b>
<b>5.3</b>	<b>Expressionsstudien an humanen Mammakarzinom-Zelllinien .....</b>	<b>105</b>
5.3.1	Die CRB3-Expression in Mammakarzinom-Zellen .....	105
5.3.2	Untersuchung CRB3A-induzierter Signalwege in Mammakarzinom-Zellen..	107
<b>5.4</b>	<b>Die Expression des CRB3A-Proteins in normalen und malignen Geweben .....</b>	<b>109</b>
<b>5.5</b>	<b>Untersuchungen zur Expression und Funktion des CRB3B-Proteins...</b>	<b>110</b>
<b>5.6</b>	<b>Allgemeine Schlussfolgerungen .....</b>	<b>111</b>
<b>5.7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>124</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>129</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>131</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>132</b>

# 1 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die onkogenen Eigenschaften des Zellpolaritätsgens Crumbs3 (CRB3) und dessen Rolle bei der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms zu untersuchen.

Untersuchungen zum transformierenden Potenzial der beiden in dieser Arbeit identifizierten CRB3-Isoformen (CRB3A und CRB3B) ergaben, dass nur CRB3A onkogene Eigenschaften besitzt. Die Überexpression des CRB3A-Proteins induzierte in NIH3T3-Fibroblasten deutliche morphologische Veränderungen, eine Steigerung der Zellproliferationsrate, ein Verankerungs-unabhängiges Wachstum *in vitro* und die Tumorbildung in Nacktmäusen. Die Expression von CRB3B vermittelte zwar einen starken proliferationsfördernden Effekt, aber keine maligne Transformation der Zellen.

Im Zuge weiterführender funktioneller Studien konnten molekulare Zusammenhänge der CRB3A-Signalkaskade in NIH3T3-Zellen aufgedeckt werden. Durch Mutationsstudien, Gentransfer-Experimente und biochemische Analysen wurde gezeigt, dass intrazelluläres CRB3A über eine C-terminale PDZ-Bindedomäne das Gerüstprotein Par6 bindet, das wiederum die kleinen RhoGTPasen Cdc42 und Rac1/2/3 rekrutiert. Die dadurch induzierten multiplen Signalwege, die sich in drastischen Veränderungen des Genexpressionsmusters widerspiegeln, sind als Auslöser der malignen Entartung der NIH3T3-Zellen zu betrachten.

Durch die Generierung isoformspezifischer CRB3-Antikörper konnten erstmals Untersuchungen zur Expression und Lokalisation der CRB3-Proteine in kultivierten Tumorzellen, sowie in nicht-neoplastischen und neoplastischen Geweben durchgeführt werden. Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse dieser Studien eher für eine Translokation als für einen Expressionsverlust des CRB3A-Proteins in Mammakarzinom-Zellen. Mit Hilfe eines generierten Modellsystems konnten ebenfalls Hinweise für CRB3A-Par6-induzierte onkogene Signalwege gefunden werden. Auf einen Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen CRB3A-Lokalisation und der onkogenen Transformation deuteten immunzytochemische Analysen an CRB3A-exprimierenden Mammakarzinom-Zellen hin. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtungen wurde durch immunhistologische Studien bestätigt. Insbesondere für das Mammakarzinom konnte eindrucksvoll dargestellt

werden, dass die in gesunden Epithelzellen detektierte apikale CRB3A-Expression während der Karzinogenese verloren geht und es zur intrazellulären Akkumulation oder zum Verlust des Proteins in Tumorzellen kommt. Interessanterweise wurde eine intrazelluläre CRB3A-Expression auch in verschiedenen nicht-neoplastischen Geweben beobachtet, was auf eine noch unbekannte Funktion des Proteins hindeutet.

Zur Funktion der CRB3B-Isoform konnten ebenfalls neue und interessante Erkenntnisse gesammelt werden. Beispielsweise wurde erstmals eine CRB3B-vermittelte Steigerung der Proliferationsrate in NIH3T3-Zellen beschrieben. Zusätzlich lieferten verschiedene Expressionsanalysen und auch Mutationsstudien ernstzunehmende Hinweise für eine sehr kurze Halbwertszeit und eine Ubiquitin-vermittelte Degradation des CRB3B-Proteins, was wiederum im Zusammenhang mit einer regulatorischen Funktion im Ablauf des Zellzyklus stehen könnte.

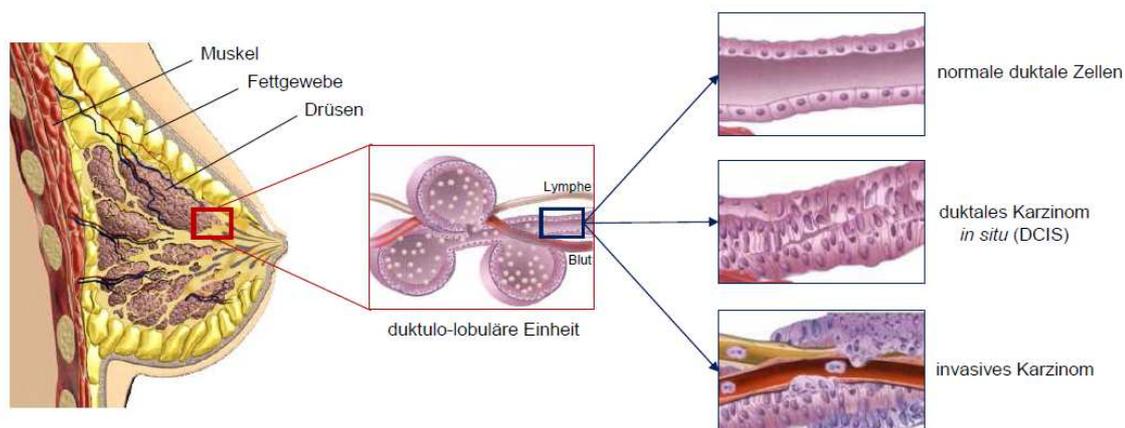
Abschließend lässt sich festhalten, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, das Zellpolaritätsgen CRB3 als neues Brustkrebs-assoziiertes Proto-Onkogen zu klassifizieren. Die hier erhobenen Daten weisen eindeutig auf eine Beteiligung des CRB3A-Proteins in der Progression des humanen Mammakarzinoms hin. Auf Basis dieser Ergebnisse könnten die hergestellten Modellsysteme der weiteren Erforschung des CRB3-Gens in der Karzinogenese dienen.

## 2 Einleitung

Das humane Mammakarzinom stellt die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung in der weiblichen Bevölkerung der westlichen Industrieländer dar. In Europa werden jährlich etwa 430 000 Neuerkrankungen und 130 000 Todesfälle registriert [1]. Durch keine andere Krebsart sterben mehr Frauen. Diese alarmierenden Zahlen führten weltweit zu erhöhten Anstrengungen bei der Entwicklung von Therapien und der Erforschung von genetischen und molekularen Veränderungen, die dieser Krankheit zu Grunde liegen. In den vergangenen 30 Jahren wurde eine Reihe von Onkogenen, Tumorsuppressor-Genen und anderen Brustkrebs-assoziierten Genen identifiziert, wodurch einerseits das Wissen über die molekularen Zusammenhänge der Krebsentstehung sprunghaft anstieg, andererseits aber auch die Komplexität der Erkrankung deutlich wurde. Nach wie vor sind viele Prozesse, die beispielsweise zur Invasion oder Metastasierung von Tumoren beitragen, nur unvollständig verstanden. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden molekulare Mechanismen untersucht, die zur malignen Entartung von Epithelzellen beitragen und somit entscheidend für die Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms sein könnten.

### 2.1 Das humane Mammakarzinom

Die weibliche Brust besteht im Wesentlichen aus Drüsengewebe und Fett und ist von zahlreichen Blutgefäßen, Nerven und Lymphgefäßen durchsetzt. Die Drüsenläppchen (Lobuli) produzieren die Muttermilch, die durch die Milchgänge (Ductuli) zur Brustwarze fließt. In den als duktulo-lobuläre Einheiten (Abb. 2.1) bezeichneten terminalen Gangsegmenten und den dazugehörigen Lobuli entstehen die meisten Mammakarzinome. Breiten sich die Tumorzellen nur innerhalb der Milchgänge (duktales Karzinom) oder Läppchen (lobuläres Karzinom) aus und wachsen nicht in umliegendes Gewebe ein, bezeichnet man sie als *in situ* Karzinom. Bei invasiven Karzinomen handelt es sich um Tumore, die das umliegende Stroma und Nachbargewebe infiltrieren und später in die Blut- und Lymphgefäße einwandern. Das duktales Karzinom *in situ* (DCIS) geht häufiger in die invasive Form über als das lobuläre Karzinom *in situ* (LCIS). Insgesamt wird zwischen 12 Typen des Mammakarzinoms unterschieden, von denen das duktales Karzinom mit über 85% am häufigsten auftritt, gefolgt vom lobulären Karzinom mit 10%. Sel-



**Abb. 2.1: Anatomie der gesunden Mamma (links) und histologische Veränderungen. Vergrößert dargestellt ist die duktulo-lobuläre Einheit (Mitte) und normale duktale Zellen, ein duktales Karzinom *in situ*, sowie ein invasives Karzinom im Vergleich (rechts), modifiziert nach [2].**

tenere Formen des invasiven Karzinoms mit vergleichsweise günstigen Prognosen sind das muzinöse, medulläre, papilläre und tubuläre Karzinom [3, 4]. Innerhalb eines Tumors können verschiedene Typen kombiniert vorliegen, was zu einer großen morphologischen Variabilität des Mammakarzinoms führt.

### 2.1.1 Die Klassifizierung invasiver Mammakarzinome

Nach Vorgaben der Internationalen Union gegen Krebs (UICC) gibt die TNM-Klassifizierung die Tumorgroße (T), den Status der regionalen Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zum Zeitpunkt der Diagnose an. Die postoperative (p) pTNM-Klassifizierung orientiert sich als histopathologische Einteilung an der Auswertung des Operationspräparats (Tab. 2.1). Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms (Tab. 2.3) erfolgt nach der pTNM-Klassifizierung (*Staging*), kombiniert mit der Bestimmung des histologischen Differenzierungsgrades (*Grading*). Das *Grading* invasiver Karzinome zur Beurteilung der Malignität und der Gewebedifferenzierung berücksichtigt das Ausmaß der Tubulusbildung, der Kernpleomorphologie, sowie die Mitoserate, und wird in drei Stufen (G1-3) angegeben (Tab 2.2). G1 stellt dabei ein gut differenziertes, G2 ein mäßig differenziertes und G3 ein schlecht differenziertes Karzinom dar [5]. Ein weiteres Kriterium zur Charakterisierung von Tumoren ist deren Status für die Expression von Rezeptoren für Östrogen und Progesteron. Beide Hormone regulieren das Zellwachstum im gesunden Brustgewebe und fördern auch das Wachstum von

Tumoren, sofern sie die entsprechenden Rezeptoren exprimieren. Der Nachweis dieser Hormonrezeptoren im Tumorgewebe erfolgt immunhistochemisch [6].

**Tab. 2.1: pTNM-Klassifizierung gemäß UICC**

pT	Primärtumor
pT1	Tumor $\leq$ 2 cm in der größten Ausdehnung
pT2	Tumor > 2 cm, aber < 5 cm in der größten Ausdehnung
pT3	Tumor > 5 cm in der größten Ausdehnung
pT4	Jeder Tumor mit Infiltration der Haut oder Brustwarze
pN	Regionale Lymphknoten
pN0	Kein Hinweis auf Befall der regionalen Lymphknoten
pN+	Metastasen in axillären Lymphknoten
pM	Fernmetastasen
pM0	Kein Hinweis auf Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen vorhanden

**Tab. 2.2: Tumordifferenzierung**

Grading	Histologische Bewertung
1	Gut differenzierter Tumor
2	Mäßig differenzierter Tumor
3	Schlecht differenzierter Tumor

**Tab. 2.3: Tumorstadien**

Stadium	pTNM-Klassifizierung
I	T1, N0, M0
II	T1, N1, M0; T2, N0-1, M0
III	Alle T, N2-3, M0; T3, alle N, M0; T4, alle N, M0
IV	Alle T, alle N, M1

### 2.1.2 Tumorprogression und Metastasierung

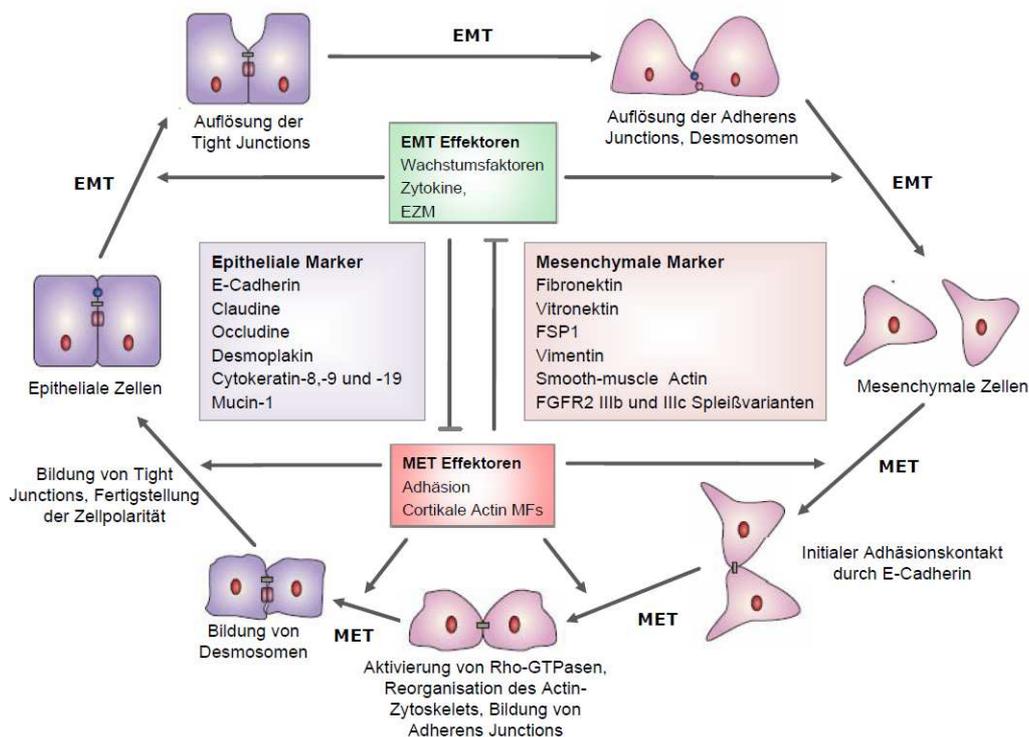
Die meisten Todesfälle unter Mammakarzinom-Patientinnen sind auf die Ausbildung von Metastasen zurück zu führen. Der Metastasierungsprozess ist äußerst komplex und setzt schon in sehr frühen Stadien der Tumorprogression ein. Die Disseminierung einzelner Tumorzellen oder Zellnester kann prinzipiell über das Lymphgefäßsystem (lymphogen) in die regionalen Lymphknoten oder über das Blutgefäßsystem (hämatogen) in das Knochenmark oder entfernte Organe erfolgen [7, 8]. Die zellulären Veränderungen die zum Übergang von gesunden Epithelzellen zur Dysplasie, weiter zum *in situ* Karzinom und schließlich zum invasiven und metastasierenden Karzinom führen, sind nur lückenhaft verstanden. Die in frühen Stadien der Progression hochdifferenzierten, epithelialen Tumorzellen entwickeln einen dedifferenzierten, migrierenden und invasiven Phänotyp. Metastatische Zellen durchbrechen die Basalmembran ihres Ursprungsgewebes, wandern in umliegendes Stroma und benachbartes Gewebe ein und erhalten schließlich Zugang zum Lymph- und Blutgefäßsystem [9]. Im Laufe dieses Prozesses verlieren die Tumorzellen ihre epithelspezifischen Zell-Zell-Kontakte, begleitet vom Zusammenbruch der apikobasalen Zellpolarität [10-12]. Gleichzeitig werden vermehrt mesenchymale Moleküle exprimiert, wodurch es zu einer gesteigerten Zellmotilität kommt. Das im Zusammenhang mit der Metastasierung am besten

charakterisierte Molekül ist das Zelladhäsionsprotein E-Cadherin. Es ist als essentieller Bestandteil der *adherens junctions* (Zonula adhaerens) entscheidend an der Ausbildung homotypischer Zell-Zell-Kontakte beteiligt und wird als wichtiger Metastasierungs-Suppressor bei verschiedensten malignen Erkrankungen angesehen. Zahlreiche Studien belegen den E-Cadherin-Verlust in unterschiedlichen Tumorarten [13]. Im Gegensatz zu den *adherens junctions* sind andere homotypische Zell-Zell-Kontaktstrukturen, wie *gap junctions* (Nexus) oder *tight junctions* (Zonula occludens), und ihre mögliche Rolle bei der Invasion und Metastasierung deutlich weniger gut untersucht [9-11], was zum Teil auf die unzureichende Kenntnis der molekularen Zusammensetzungen zurück zu führen ist. Im Falle der *tight junctions* gelang es in den letzten Jahren wichtige Proteine zu identifizieren, die an Aufbau und Funktion dieser Strukturen beteiligt sind [14].

Der mit der Tumorprogression einhergehende Abbau von Zell-Zell-Kontakten und die damit verbundene Dedifferenzierung von Tumorzellen stellen bemerkenswerte Parallelen zu einem entwicklungsbiologischen Prozess dar, der als Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet wird. Eine zunehmend akzeptierte Theorie besagt, dass es in Tumorzellen epithelialen Ursprungs zumindest teilweise zur Rekapitulation dieses morphogenetischen Programms kommt.

### 2.1.3 Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) in der Tumorprogression

Als EMT wird allgemein die Abfolge von Ereignissen bezeichnet, die zur Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen führt. Der Prozess wurde erstmals 1982 von Greenburg und Hay beschrieben [15]. Hauptmerkmale einer EMT sind die derangierte epitheliale Zellpolarität, der Abbau von Zell-Zell-Kontakten, eine reduzierte Anheftung der Zellen an der Basallamina und eine geänderte Zellmorphologie, was zur Aufhebung der ursprünglichen Gewebsarchitektur und Gewebefunktion führt [16]. Einzelne Stadien der EMT sind in Abb. 2.2 dargestellt. EMT-Auslöser sind Veränderungen in der Expression, der intrazellulären Verteilung und Funktion von Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , *transforming growth factor beta*), Transkriptionsfaktoren (Snail, nukleäres  $\beta$ -Catenin), Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen (Cadherine, Claudine, Occludine), Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen (Integrine), Modulatoren des Zytoskeletts (Rho GTPasen) und extrazellulären Proteasen (Matrixmetalloproteinasen) [17].



**Abb. 2.2: Schematischer Ablauf der Epithelial-Mesenchymalen-Transition und des reversen Prozesses, der Mesenchymal-Epithelialen-Transition. Unterschiedliche Stadien des Kreislaufs sind durch die Expression spezifischer Marker gekennzeichnet. Antagonistisch wirkende Effektoren regulieren die Übergänge zwischen den epithelialen und mesenchymalen Phänotypen. Modifiziert nach [18].**

Ein sehr frühes Schlüsselereignis stellt die Dissoziation der *tight junctions* dar, gefolgt vom Verlust der *adherens junctions*, bedingt durch die initiale Repression von E-Cadherin. Mit fortschreitender Transition werden die am Aufbau der Intermediärfilamente beteiligten Cytokeratine häufig gegen Vimentin ausgetauscht und vermehrt Moleküle exprimiert, die den Zellen migratorische Fähigkeiten verleihen, wie Fibronektin und Vitronektin [19-21]. Durch den reversen Prozess, die Mesenchymal-Epithelialen-Transition (MET), kann es zur Wiederherstellung des epithelialen Phänotyps kommen [18].

Partielle oder vollständige epithelial-mesenchymale Zellumwandlungen laufen während der Embryogenese von fast allen mehrzelligen Organismen ab, beispielsweise bei der Gastrulation, der Etablierung von Ekto-, Meso- und Endoderm oder der Bildung der Neuralröhre [22]. Die Regulierung der EMT ist von den Fruchtfliegen (*Drosophila*) bis zu den Säugetieren hochkonserviert. Mutationsstudien an *Drosophila* zeigten, dass die Transkriptionsfaktoren Snail und Twist essenziell sind für die Entwicklung des Mesoderms und den korrekten Ablauf der Gastrulation.

Snail reprimiert die Expression von *Shotgun*, dem Orthologen des E-Cadherin-Gens bei Vertebraten [23]. Die Gastrulation bei Mäusen (*Mus musculus*) wird durch den FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor-1*) kontrolliert, der die Expression des SNAI1-Faktors reguliert, der wiederum E-Cadherin inhibiert [23].

Zahlreiche Studien belegen, dass EMT-Signalwege während der Progression verschiedener Tumorarten aktiviert sind. Entwickeln Tumorzellen ein invasives und metastatisches Potenzial, übernehmen sie Genexpressionsmuster und Eigenschaften, die für den mesenchymalen Phänotyp charakteristisch sind. Es werden vermehrt Vimentin, FSP-1, SNAI1 und SNAI2 oder nukleäres  $\beta$ -Catenin exprimiert, während die Expression von E-Cadherin oder den Cytokeratinen 8, 9 und 18 reduziert wird oder ganz verloren geht (Abb. 2.2). Eine verringerte Zelladhäsion, sowie die gesteigerte Proteolyse und Beweglichkeit der Zellen fördern zudem die Metastasierung von Tumoren [24]. Blasenkarzinomzellen konvertierten in wandernde Fibroblasten nach Aktivierung der FGFR1B-Tyrosinkinase und nachgeschalteter Src- und Ras-Signalwege [25]. Für kolorektale Karzinomzellen wurde ebenfalls eine SNAI1-abhängige Regulation vieler EMT-assoziiierter Gene gezeigt [26]. Moody et al. entwickelten ein Maus-Modellsystem, um die Rolle der EMT in der Progression des Mammakarzinoms zu untersuchen. Sie zeigten, dass das Wachstum regressiver Tumore durch die Expression von Snail erneut stimuliert wurde und es zur Ausbildung von Metastasen kam. Die isolierten Tumore bestanden aus mesenchymalen Zellen [27]. Für einen weiteren EMT-Transkriptionsfaktor, FOXC2, wurde eine Überexpression in aggressiv-invasiven duktalem Mammakarzinomen nachgewiesen [28]. In kultivierten H-Ras-transformierten Brustepithelzellen konnte ein NF- $\kappa$ B-abhängiger Zusammenhang zwischen der TGF- $\beta$ -induzierten EMT und dem metastatischen Potenzial der Zellen hergestellt werden [29].

Die EMT-Transkriptionsfaktoren Snail und ZEB-1/-2 regulieren neben E-Cadherin auch epithelzellspezifische Gene herab, die Komponenten der *tight junctions* sind. Eine direkte Regulation für Occludin und Claudin-1 und -7 wurde beschrieben [26, 30-33]. Durch Genexpressionsstudien an Karzinomzellen konnte eine verringerte Expression von Claudin-4 und JAM-1 (*junctional adhesion molecule-1*) nachgewiesen werden. Die gleichen Gene werden auch in MDCK-Zellen (Hundenierenzellen) reprimiert, die eine EMT durchlaufen [26, 34, 35]. Da der Aufbau und die Funktion von *tight junctions* direkt mit der Organisation der zellulären Polarität

assoziiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch Mitglieder der sogenannten Zellpolaritätskomplexe in die Regulation der EMT involviert sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass direkte Wechselwirkungen zwischen Occludin, dem TGF- $\beta$ -Rezeptor 1 und dem Zellpolaritäts-Protein Par6 [36, 37] zur Dissoziation von *tight junctions* und zum Verlust der Zellpolarität beitragen [38]. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass Snail und ZEB1 ebenfalls die Expression des in dieser Arbeit untersuchten Crumbs3 (CRB3)-Gens regulieren [39, 40]. Bei CRB3 und Par6 handelt es sich um Komponenten der sogenannten epithelialen Zellpolaritätskomplexe, deren Aufbau und Funktion im folgenden Kapitel erläutert werden.

## 2.2 Die epitheliale Zellpolarität

Die epitheliale Zellpolarität entsteht durch asymmetrische Verteilung von Lipiden, Proteinen und anderen Molekülen in der Zellmembran und dem Zytoplasma. Epithelzellen bilden apikale, laterale und basale Membrandomänen aus. Die apikale Seite ist dabei stets dem Lumen eines Organs zugewandt. Die Etablierung der Zellpolarität ist direkt abhängig von der Ausbildung lateraler Zell-Zell- und basaler Zell-Matrix-Kontakte und deren Interaktion mit Molekülen des Zytoskeletts. Am Übergang vom apikalen Pol zur lateralen Domäne bilden die undurchlässigen *tight junctions* eine Diffusionsbarriere innerhalb der Zellmembran, aber auch zwischen dem Epithel und der Umgebung aus. Weiter lateral befinden sich *adherens junctions*, Punkt- oder Streifendesmosomen (Punctum adhaerens, Fascia adhaerens) und *gap junctions*, letztere sind kommunizierende Zell-Zell-Verbindungen. Haftverbindungen zur Basallamina und Extrazellulären-Matrix werden durch Hemidesmosomen und Integrine hergestellt [41-44]. Obwohl die intrazellulären Sortierungsmechanismen von neusynthetisierten Lipiden und Proteinen bereits gut verstanden sind, ist noch relativ wenig bekannt über die initiale Etablierung der Zellpolarität [45, 46]. Durch Studien an *Drosophila melanogaster* und Säugetierzellen, hauptsächlich MDCK-Zellen, wurde eine Vielzahl von Molekülen identifiziert, die ein äußerst komplexes und dynamisches Proteinnetzwerk ausbilden, deren detaillierte Zusammensetzung darzustellen die Grenzen dieser Arbeit bei weitem überschreiten würde. Der Fokus wird an dieser Stelle auf drei Proteinkomplexe gerichtet, die als Hauptregulatoren der Zellpolarität gelten (*Drosophila* Orthologe in Klammern): Crumbs-PALS1(Stardust)-PATJ

(Discs Lost) und Par3(Bazooka)-Par6-aPKC an der apikalen und Scribble/DLG/LGL an der lateralen Membrandomäne (Abb. 2.3).

### 2.2.1 Die apikobasalen Zellpolaritäts-Komplexe

Für die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Analysen sind ausschließlich die Interaktionen zwischen den Crumbs- und Par-Komplexen relevant. Um dennoch den Überblick über das Zusammenspiel der Zellpolaritätskomplexe zu wahren, wird neben den Crumbs- und Par-Komplexen auch die Komposition des Scribble-Proteinkomplexes ausführlicher erläutert.

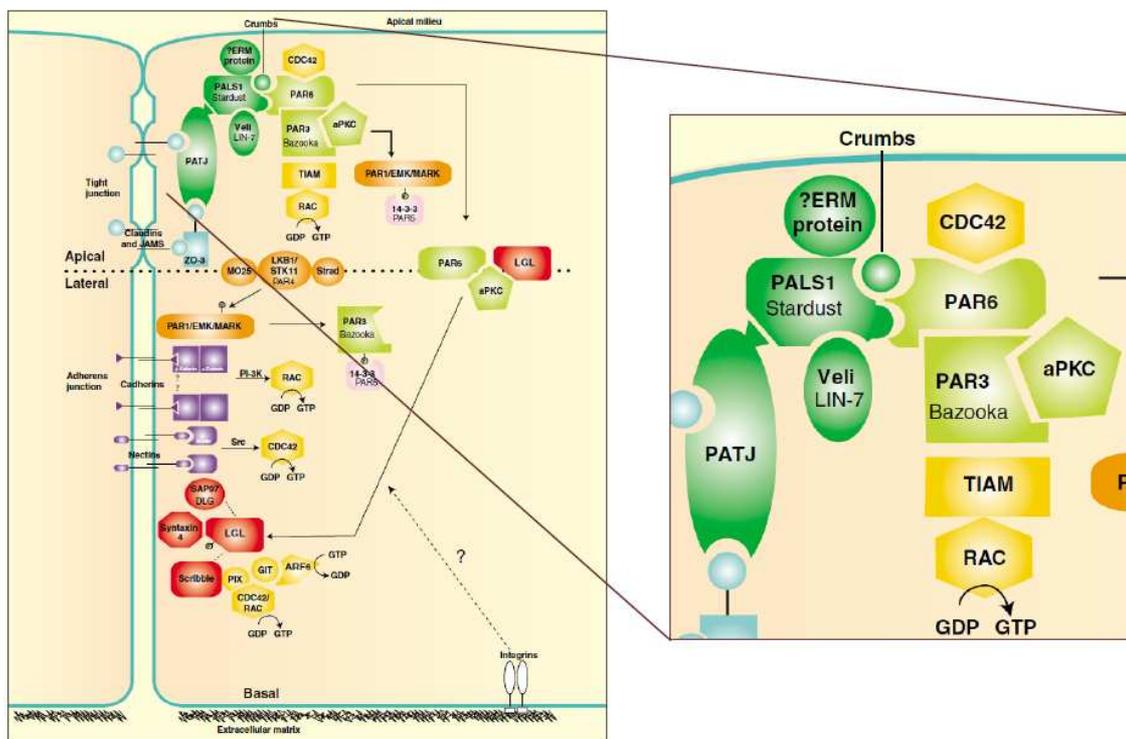


Abb. 2.3: Ein komplexes Netzwerk von Proteinen reguliert die Entstehung und Aufrechterhaltung der apikalen, lateralen und basalen Membranstrukturen in Epithelzellen. Die gepunktete Linie zeigt die Grenze zwischen apikalen und basolateralen Membrandomänen an. Vergrößert dargestellt sind die direkt interagierenden und apikal lokalisierten Proteinkomplexe Crumbs/PALS1/PATJ (dunkelgrün) und PAR6/PAR3/aPKC (hellgrün), aus [47].

#### Der Crumbs-Komplex

Das ursprünglich in *Drosophila melanogaster* identifizierte Transmembran-Protein Crumbs ist in der apikalen Membran verankert und bindet über seinen C-Terminus an eine PDZ-Domäne in PALS1 (Stardust) [48, 49]. Über ein weiteres intrazelluläres Bindemotiv interagiert Crumbs mit einem Mitglied der Ezrin-Radixin-Moesin

(ERM)-Proteinfamilie, wobei die Rolle dieser Bindung für die Zellpolarität bisher unklar ist [50]. Vermutlich kommt dieser Interaktion eher eine stabilisierende und weniger eine essenzielle Funktion zu. Bei PALS1 handelt es sich um ein Gerüstprotein mit verschiedenen Protein-Protein-Wechselwirkungsdomänen. Es zählt zur Familie der Membranassoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK). Über eine L27-Domäne bindet PALS1 das kleine PDZ-Protein Lin-7 (PALS1, *protein associated with Lin-seven*) und über eine zweite L27-Domäne bindet es PATJ (*Discs Lost*). PATJ ist ebenfalls ein zytoplasmatisches Gerüstprotein und eng verwandt mit MUPP1. Es enthält neben einer L27-Domäne zahlreiche PDZ-Bindedomänen, über die wiederum direkte Assoziationen zu den ZO-Proteinen und Claudinen der *tight junctions* (PATJ, *protein associated with tight junctions*) hergestellt werden. Ein RNAi-vermittelter *knock down* von PALS1 führte zum Verlust der PATJ-Expression in MDCKII-Zellen, was zu einer fehlerhaften Ausbildung der apikobasalen Membranpolarität und der *tight junctions*-Strukturen führte [51]. Desweiteren war der exozytotische Transport und der Einbau von E-Cadherin in die *adherens junctions* verlangsamt. Wichtige Erkenntnisse über die Funktion von PATJ ergaben sich aus Studien mit Caco2-Zellen (humane Intestinalzellen). Eine reduzierte Expression von PATJ verhinderte die Rekrutierung von PALS1 an den apikalen Pol. Das Crumbs-Protein akkumulierte in Endosomen-ähnlichen Kompartimenten nahe der apikalen Membran. Desweiteren zeigte sich eine Fehllokalisierung der *tight junctions*-Proteine ZO-3 und Occludin an der lateralen Membran, was die Funktion von PATJ für den Aufbau der Haftverbindungen deutlich machte [52, 53].

### **Der Par-Komplex**

Die Bedeutung des Par-Komplexes für die Zellpolarität wurde zuerst am Modell der *C. elegans* Zygote beschrieben und mittlerweile auch an anderen Zellsystemen bestätigt [54, 55]. In Vertebraten ist der Par-Komplex beispielsweise auch an Prozessen der gerichteten Zellmigration [56] und des Axon-Wachstums in Nervenzellen [57] beteiligt. Par3 und Par6 sind Zellgerüst-Proteine, die über ihre PDZ-Bindedomänen in zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen involviert sind. Par6 bindet über das PB1-Motiv die atypische Proteinkinase C (aPKC; Abb. 2.3). Die aPKC-vermittelte Phosphorylierung einiger Proteine (Par6, Par1, LGL, etc.) beeinflusst deren Lokalisierung entlang des apikolbasalen Gradienten, was ein

Schlüsselmechanismus für die Formierung der Proteinkomplexe zu sein scheint. Die Phosphorylierung von LGL (*lethal giant larvae*) führt zum Zerfall des apikalen LGL-Par6-aPKC-Komplexes und zur lateralen Sortierung des Proteins, wo es in Wechselwirkung mit Scribble und DLG (*Discs Large*) tritt [58-60]. Weitere wichtige Effektoren des Par-Komplexes sind die kleinen Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1/2/3, wobei insbesondere die Funktion von Cdc42 evolutionär hochkonserviert ist. Cdc42 bindet an Par6 und erhöht die Aktivität von aPKC innerhalb des Par3-Par6-aPKC-Komplexes [61-63]. Eine zusätzliche Wechselwirkung zwischen Rac und Tiam1, das seinerseits von Par3 rekrutiert wird, scheint ebenfalls wichtig zu sein für die Bildung der *tight junctions* [64].

### ***Der Scribble-Komplex***

Die basolateral lokalisierten Proteine Scribble, DLG und LGL agieren als Antagonisten der apikalen Crumbs- und Par-Komplexe. In *Drosophila* führt eine gestörte Aktivität dieser Proteine zur Fehlsortierung apikaler Marker, gefolgt von einer Expansion der lateralen Membrandomäne und epithelialen Wucherungen [65]. Die molekularen Grundlagen dieses Defekts sind allerdings noch ungeklärt, denn bisher konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass Scribble, DLG und LGL tatsächlich einen Komplex bilden. Die Proteine könnten auch in andere Signalwege involviert sein, deren Inbalance zur Tumorbildung bei *Drosophila* führen [66]. In Säugetier-Epithelien sind Scribble, DLG und LGL hauptsächlich als Effektoren des Proteintransports und der subzellulären Lokalisation beschrieben. LGL interagiert mit Syntaxin 4, einer Komponente der basolateralen Exozytose-Maschinerie [67], während Scribble mit Regulatoren der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1/2/3 wechselwirkt [68].

### ***Funktionelle Interaktionen zwischen den Polaritätskomplexen***

Eine direkte Interaktion zwischen den apikalen Crumbs- und Par-Komplexen wurde unter anderem an MDCKII-Zellen nachgewiesen. Par6 bindet aminoterminal an eine PDZ-Domäne in PALS1, wobei Cdc42 einen regulatorischen Einfluss auf diese Wechselwirkung hat. Gleichzeitig bindet Crumbs an die PDZ-Domäne von Par6, wodurch es zur Bildung eines ternären Proteinkomplexes kommt [69-71]. Aufgrund seiner ubiquitären Expression wird dem Par-Komplex dabei eher die Rolle eines universellen Effektors der Zellpolarität zugeschrieben.

Der Crumbs-Komplex wird epithelspezifisch exprimiert und erfüllt die Funktion eines Adapters, der den Par-Komplex zur apikalen Membran rekrutiert.

Die Crumbs-Proteine stellen als einzige membranständige Proteine innerhalb der Polaritätskomplexe einen „Kristallisationspunkt“ für die Etablierung der epithelialen Zellarchitektur dar. In Anbetracht der Tatsache, dass die meisten Tumore beim Menschen durch die Entartung von Epithelzellen entstehen, drängt sich die Frage nach einer Verwicklung dieser Proteine in Prozesse, die zu epithelialen Wucherungen führen könnten, auf. In der hier vorliegenden Arbeit wird erstmals untersucht, ob ein Vertreter der humanen Crumbs-Proteine, das CRB3, in die Progression des Mammakarzinoms involviert ist.

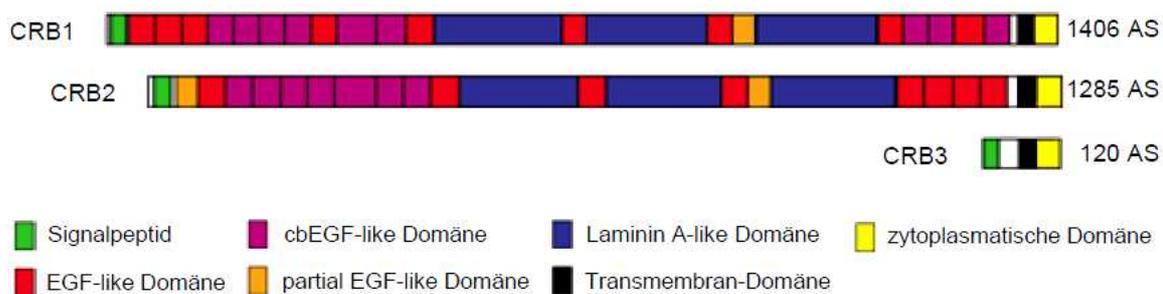
### 2.3 Die Familie der Crumbs (Crb) Proteine

Der Zusammenhang zwischen epithelialer Zellpolarität und Crumbs (Crb) wurde erstmals 1990 von Tepass et al. beschrieben [72]. Ursprünglich identifiziert wurde das Gen zuvor im Rahmen von Mutationsstudien an *Drosophila* von Nüsslein-Volhard et al. [73]. Crumbs (Crb) ist ein aus 2139 Aminosäuren aufgebautes transmembranäres Glykoprotein, das aus einer extrazellulären Domäne mit 30 „EGF-like repeats“ und weiteren 4 „Laminin A G-domain-like repeats“, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (37 Aminosäuren) besteht. Durch die Akkumulation des Proteins in der Marginalzone embryonaler Epithelzellen wird deren apikale Membran determiniert. In der Marginalzone werden interzelluläre Haftverbindungen (*septate junctions*) ausgebildet, die den *tight junctions* in Epithelzellen von Säugetieren entsprechen [41, 48, 49, 74, 75]. Die Expression des Proteins spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Stadien der Organogenese in *Drosophila*-Embryonen. Bei adulten Fliegen wird das Protein in der subapikalen Region (SAR) der Photorezeptorzellen exprimiert. *Loss-of-function* Mutationen im *Crb*-Gen führen zur Ausprägung einer defekten, krümeligen (*crumbs*, engl. Krümel) Kuticula und degenerierten Photorezeptorzellen. Bis heute konnten mit Hilfe der Ensembl- und UCSC Genome Browser-Datenbanken verschiedene Varianten des Crb-Proteins bei insgesamt 18 Spezies detektiert werden [76, 77]. Bei allen bekannten Crb-Homologen ist die C-terminale PDZ-Bindedomäne zur Ausbildung des beschriebenen Proteinnetzwerks (Abb. 2.3) hochkonserviert. Im Fadenwurm (*C. elegans*) gibt es 2 Crb-Gene und

das Zebrafisch-Genom (*Danio rerio*) enthält 5 homologe Gene, was teilweise auf die Duplikation des Gesamtgenoms bei Echten Knochenfischen (*Teleostei*) zurückgeführt wird. Das Genom von Maus (*Mus musculus*) und Mensch (*Homo sapiens*) kodiert jeweils für 3 Crb-Gene [78].

### 2.3.1 Die humanen Crumbs (CRB) Homologe

Die humanen Crumbs Homologe - CRB1, CRB2 und CRB3 - weisen ein gewebespezifisches Expressionsmuster auf. Während die Expression von CRB1 und CRB2 auf Retina, Gehirn und Niere beschränkt ist, wird CRB3 in einem breiteren Spektrum von Geweben epithelialen Ursprungs exprimiert [79-83]. Für CRB1 sind zwei alternative Spleißvarianten beschrieben, die sich in den 3'-Enden ihrer Transkripte unterscheiden. Die längere Variante kodiert für ein aus 1406 Aminosäuren aufgebautes Transmembranprotein mit zahlreichen *EGF-like* und *Laminin A-like repeats* in der extrazellulären Proteindomäne (Abb 2.4). Die kürzere Transkriptvariante kodiert für eine sekretierte Form des Proteins, dem die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne fehlen. Mutationen im CRB1-Gen können retinale Dystrophien, wie die autosomale rezessive Retinitis Pigmentosa (arRP) oder Lebersche Kongenitale Amaurose (arLCA), verursachen [78].



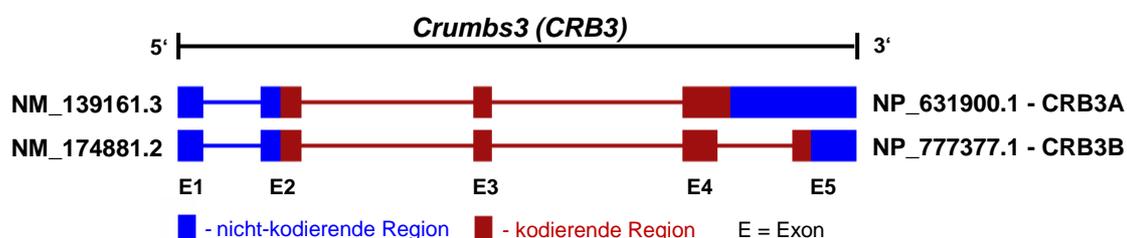
**Abb. 2.4: Proteinstruktur der drei humanen Crumbs Homologe. Im Gegensatz zu CRB1 und CRB2 besitzt CRB3 eine sehr kurze extrazelluläre Domäne. Die Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen sind bei allen 3 CRB-Proteinen hochkonserviert.**

Zur Charakterisierung von CRB2 gibt es bisher nur wenige Arbeiten. Das CRB2-Protein ist aus 1285 Aminosäuren aufgebaut (Abb 2.4) und enthält, ähnlich wie CRB1, eine große extrazelluläre Domäne mit *EGF-like* und *Laminin A-like* Domänen. Ein Zusammenhang zwischen Mutationen im CRB2-Gen und den CRB1-

assoziierten Augenkrankheiten konnte nicht gefunden werden. Welche Funktionen die großen extrazellulären Domänen von CRB1 und CRB2 im Einzelnen erfüllen, ist noch ungeklärt. Potenzielle Liganden der *EGF-like* und *Laminin-A-like repeats* konnten bisher nicht identifiziert werden. Im Gegensatz zu CRB1 und CRB2 kodiert das CRB3-Gen für ein relativ kleines Protein mit einer sehr kurzen extrazellulären Domäne (Abb 2.4). Hohe Sequenzhomologien zwischen allen 3 CRB-Proteinen zeigen sich in den Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen, die als „Anker“ und Adapter für andere Polaritätsproteine agieren [83].

### 2.3.2 Crumbs3 (CRB3)

Das auf Chromosom 19p13.3 lokalisierte *Crumbs3* (CRB3)-Gen kodiert für 2 unterschiedliche Isoformen des CRB3-Proteins. Das CRB3-Primärtranskript enthält 4 Exons und 3 Introns, wobei die kodierenden Sequenzen in den Exonen 2, 3 und 4 liegen. Durch alternatives Spleißen kommt es zur Deletion eines Sequenzabschnittes in Exon 4, wodurch ein zusätzliches 5. Exon kreiert wird. Die resultierenden mRNA-Transkripte unterscheiden sich somit in ihren 3'-kodierenden Sequenzbereichen [84].



**Abb. 2.5:** Durch alternatives Spleißen des CRB3-Primärtranskripts entstehen 2 unterschiedliche CRB3-Transkriptvarianten, die für 2 Isoformen des CRB3-Proteins kodieren. Links und rechts neben den Transkripten sind jeweils Referenz-Nummern der NCBI-Datenbank für die Transkriptsequenzen (NM) und die Peptidsequenzen (NP) angegeben [84].

Die längere Transkript-Variante (1439 bp) kodiert für ein Protein mit 120 Aminosäuren, die CRB3 Isoform A (CRB3A). Das kürzere Transkript wird in ein aus 123 Aminosäuren aufgebautes Protein translatiert, die CRB3 Isoform B (CRB3B). Für beide Isoformen ist die extrazelluläre Domäne mit einer N-Glykosylierungsstelle, die Transmembrandomäne und Teile der zytoplasmatischen Domäne, inklusive einer FERM-Bindestelle, bis zur Aminosäure-Position 100 identisch. Die aus 20 beziehungsweise 23 Aminosäuren bestehenden C-terminalen Proteindomänen

sind jeweils isoformspezifisch. Nur CRB3A trägt am C-Terminus das konservierte ERLI-Motiv zur Bindung von PDZ-Proteinen. Erstmals charakterisiert wurde CRB3 von Makarova et al. [85]. Als Matrize für die Klonierung der vollständigen CRB3-cDNA diente eine aus der humanen Retina generierte cDNA-Bibliothek. Die Expression der CRB3-mRNA konnte auch in anderen humanen Geweben nachgewiesen werden, z. B. in Lunge, Kolon, Leber, Milz, Pankreas, Plazenta und Prostata [85]. Durch *in vitro*-Studien an MDCK-Zellen konnten PALS1 und PAR6 als direkte Interaktionspartner von CRB3A identifiziert werden. In weiteren Arbeiten an MDCK- und humanen MCF10A-Brustepithelzellen wurde gezeigt, dass sowohl der Verlust als auch die Überexpression des CRB3A-Proteins nachteilige Effekte auf die Ausbildung der epithelialen Zellpolarität und der *tight junctions*-Strukturen hat. Deletionen der ERLI-Sequenz führten dabei stets zum Funktionsverlust, während Mutationen der FERM-Bindedomäne und der putativen aPKC-Phosphorylierungsstelle schwache oder keine Effekte zeigten [71, 86, 87]. Über die CRB3 Isoform B ist aktuell nur wenig publiziert. Kürzlich wurde eine Funktion des Proteins in der Regulation des Zellzyklus an MDCK-Zellen beschrieben [88]. CRB3B ist demnach in der Membran von Cilien lokalisiert und assoziiert während der Zellteilung mit Membranstrukturen in der Nähe des Spindelapparates, wo es mit einem Kerntransport-Protein (Importin- $\beta$ ) interagiert. Der *knock down* von CRB3B führte zum Verlust der Cilien und zu multinukleären Zellen mit abnormal aufgebauten Centrosomen und Spindelapparaten.

Abschließend lässt sich festhalten, dass es sich bei CRB3 um ein epithelzell-spezifisches, membranständiges Zellpolaritätsprotein handelt, über dessen mögliche Bedeutung in der Karzinogenese bisher noch nichts bekannt ist.

## 2.4 Fragestellung

Die Grundlage für die hier vorliegende Studie wurde innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe durch die Entwicklung einer retroviralen Expressionsbibliothek zur Identifizierung Brustkrebs-assoziiierter Proto-Onkogene geschaffen. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde unter anderem CRB3 als potenzieller Vermittler der zellulären Transformation identifiziert.

Im ersten Teil der Arbeit war das primäre Ziel die im Vorfeld gemachten Beobachtungen durch entsprechende experimentelle Ansätze am Modellsystem der murinen NIH3T3-Fibroblasten zu validieren und verifizieren, um zu klären ob CRB3 als ein neues Proto-Onkogen klassifiziert werden kann. Darauf aufbauend galt das Interesse der Entschlüsselung molekularer Signalwege, die an der Vermittlung einer CRB3-induzierten Transformation beteiligt sind.

Im Mittelpunkt eines anderen Arbeitsabschnitts stand die Frage nach der physiologischen Relevanz und der Rolle von CRB3 bei der Progression des humanen Mammakarzinoms. Für die Durchführung umfangreicher Expressionsstudien an kultivierten Zelllinien und Gewebeschnitten sollten zunächst isoformspezifische CRB3-Antikörper hergestellt und charakterisiert werden. Die Etablierung eines geeigneten Modellsystems sollte anschließend die Grundlage für weiterführende funktionelle Studien und die Untersuchung der CRB3-Signalwege in Mammakarzinom-Zellen bilden.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist aufzuklären, ob CRB3 an der malignen Entartung von Zellen, insbesondere von Brustepithelzellen, beteiligt ist. Damit sollen neue Einsichten in zelluläre Vorgänge und die Progression des humanen Mammakarzinoms gewonnen werden, was ferner der Entwicklung innovativer Therapieansätze zur Bekämpfung dieser Erkrankung dienen könnte.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Die Auflistung aller verwendeten Geräte, Plasmide und Oligonukleotid-Primer, sowie Antikörper ist dem Anhang der Arbeit zu entnehmen.

#### 3.1.1 Chemikalien

Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

#### 3.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

<u>PBS</u>		<u>TBS</u>	
137 mM	NaCl	50 mM	Tris-HCl
2,7 mM	KCl	2,7 mM	KCl
4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	138 mM	NaCl
1,4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 8,0	
pH 7,3			

### 3.2 Zellkulturmethoden

#### 3.2.1 Kulturmedien und -zusätze

##### Kulturmedium 1 – DMEM-Medium

90 % (v/v) DMEM (4,5 g/L D-Glucose, 110 mg/L Pyruvat; Gibco, Eggenstein)

10 % (v/v) FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

2 mM Glutamin (Gibco)

##### Kulturmedium 2 – RPMI-Medium

90 % (v/v) RPMI 1640 Medium (Gibco)

10 % (v/v) FCS (PAA Laboratories GmbH)

2 mM Glutamin (Gibco)

Trypsin/EDTA-Lösung (1x)

0,25 % (w/v) Trypsin (Gibco)

1 mM EDTA (Gibco)

in PBS ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> (Gibco)**3.2.2 Herkunft der Zelllinien****Tab. 3.1: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Zelllinien**

Zelllinie	Ursprung	Tumorart	Kulturmedium
BT-20 <sup>1)</sup>	Primärtumor	duktales Mammakarzinom	1
BT-474 <sup>1)</sup>	Primärtumor	duktales Mammakarzinom	2
GI-101 <sup>3)</sup>	lokales Rezidiv	duktales Mammakarzinom	1
MCF-7 <sup>2)</sup>	Pleuraeffusion	duktales Mammakarzinom	1
MDA-MB-231 <sup>1)</sup>	Pleuraeffusion	duktales Mammakarzinom	1
MDA-MB-435S <sup>2)</sup>	Pleuraeffusion	duktales Mammakarzinom	1
MDA-MB-468 <sup>2)</sup>	Pleuraeffusion	Adenokarzinom der Brust	1
SK-BR-3 <sup>2)</sup>	Pleuraeffusion	duktales Mammakarzinom	2
T-47D <sup>2)</sup>	Pleuraeffusion	duktales Mammakarzinom	2
ZR-75-1 <sup>2)</sup>	Aszites	duktales Mammakarzinom	1
Hela <sup>2)</sup>	Primärtumor	Xervix-Adenokarzinom	1
MDCK <sup>4)</sup>	Nierenzellen ( <i>Canis</i> )	--	1
NIH3T3 <sup>2)</sup>	murine embryonale Fibroblasten	--	1
ΨNX-eco <sup>2)</sup>	humane embryonale Nierenzellen	--	1

<sup>1)</sup>erhalten von American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA<sup>2)</sup>erhalten aus der Zellkulturbank des ICRF Laboratory, St Thomas' Hospital, London, UK<sup>3)</sup>erhalten von Dr. J. Hurst, Goodwin Institut for Cancer Research, Plantation, Florida, USA<sup>4)</sup>erhalten von Prof. Dr. Thomas Bräulke, Institut für Biochemie/Kinderklinik, UKE Hamburg**3.2.3 Kulturbedingungen**

Alle Zelllinien wurden in sterilen Kulturflaschen/-schalen der Firmen BD Falcon (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) kultiviert. Eine Übersicht über die verwendeten Kulturgefäße gibt Tab 3.2. Die Kultivierung erfolgte in Hera150-Brutschränken

(Kendro, Langensfeld) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> für Zellen in RPMI-Medium bzw. 10% CO<sub>2</sub> für Zellen in DMEM-Medium. Die Zelllinien wurden zwei- bis dreimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen passagiert. Hierzu wurden die adhärenz wachsenden Zellen mit PBS (Gibco) bei 37°C gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturschale abgelöst. Der Vorgang wurde durch Zugabe von vorgewärmtem Vollmedium und anschließender Zentrifugation für 3 min bei 1200 g abgestoppt, die Zellen in 5-10 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer Dichte von 10-20% ausgesät.

**Tab. 3.2: Verwendete Zellkulturgefäße**

Kulturschalen	Oberfläche pro well <sup>1)</sup>	Mediumvolumen	Hersteller
96-well-Platte	0,2 cm <sup>2</sup>	0,15 ml	BD Falcon
24-well-Platte	1,9 cm <sup>2</sup>	1 ml	BD Falcon
6-well-Platte	9,4 cm <sup>2</sup>	2,5 ml	BD Falcon
6cm-Schale	22 cm <sup>2</sup>	5 ml	BD Falcon
10cm-Schale	78 cm <sup>2</sup>	15 ml	BD Falcon
T25-Zellkulturflasche	25 cm <sup>2</sup>	5 ml	Nunc
T75-Zellkulturflasche	75 cm <sup>2</sup>	15 ml	Nunc
T175-Zellkulturschale	175 cm <sup>2</sup>	50 ml	Nunc

<sup>1)</sup>In dieser Arbeit wird an Stelle des deutschen Begriffes „Vertiefung“ das für Laborarbeiten gebräuchliche englische Wort „well“ benutzt.

### 3.2.4 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen können durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C) für lange Zeit gelagert und wieder in Kultur genommen werden. Um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, wird den Zellen durch Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxids (DMSO) langsam das Wasser entzogen. Mindestens  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (90% (v/v) Vollmedium, 10% (v/v) DMSO) resuspendiert, in 1,5 ml-Kryoröhrchen (Nunc) überführt und auf -80°C gekühlt. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen kryokonservierter Zellen erfolgte für 1-2 min bei 37°C im Wasserbad. Die Zellsuspension wurde mit 5 ml Vollmedium versetzt und pelletiert um das toxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 12 ml Vollmedium resuspendiert und in geeigneter Dichte wieder ausgesät.

### **3.2.5 Mycoplasmen-Test**

Alle kultivierten Zellen wurden in regelmäßigen Abständen einem Mycoplasmen-Test unterzogen, um eine mögliche Kontamination der Zellkulturen zu detektieren. Hierfür wurde der Venor<sup>®</sup> GeM Kit (Minerva Biolabs, Berlin) verwendet. Der Test wurde mit halbiertem Reaktionsvolumen nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **3.2.6 Transfektion eukaryontischer Zellen mit kationischen Lipiden**

Für die Transfektion eukaryontischer Zelllinien wurden unterschiedliche Transfektionsreagenzien verwendet, die alle der Gruppe der kationischen Liposom-Reagenzien angehören. Liposom-Reagenzien binden im Komplex mit Plasmid-DNA an negativ geladene Oberflächenstrukturen der Zellen und werden durch Fusion mit der Plasmamembran endosomal von den Zellen aufgenommen.

Transient transfizierte Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert und die Expression des Transgens durch eine Western Blot Analyse (siehe 3.4.3) überprüft.

Für die Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion trypsiniert und je nach Konfluenz in einem Verhältnis von 1:15 oder 1:30 in 10 cm-Kulturschalen umgesetzt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 0,5 mg/ml Geneticin (G-418, Calbiochem, Darmstadt) selektioniert. Um klonale, stabile Zelllinien zu generieren wurden etwa zehn Tage nach Beginn der Selektion einzelne Zellklone isoliert. Mit Hilfe von kleinen Trypsin-getränkten Filterpapieren wurden die Zellklone vom Boden der Kulturschale abgelöst und in 96-well-Platten transferiert. Die Klone wurden expandiert, kryokonserviert und hinsichtlich der stabilen Expression des Transgens mittels Western Blot (siehe 3.4.3) analysiert. In Abhängigkeit von der Zelllinie wurden verschiedene Reagenzien für die Durchführung der Transfektion verwendet.

#### **3.2.6.1 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Lipofectamine 2000<sup>TM</sup>**

Für eine Transfektion mit Lipofectamine 2000<sup>TM</sup> (Invitrogen, Karlsruhe) wurden einen Tag zuvor Zellen in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät, so dass am Tag der Transfektion eine Zelldichte von 80-90% erreicht war. Zur Durchführung der Transfektion wurden 8 µg Plasmid-DNA mit 500 µl OptiMEM (Gibco) gemischt. In

einem zweiten Ansatz wurden 20 µl Lipofectamine 2000<sup>TM</sup>-Transfektionsreagenz mit 500 µl OptiMEM (Gibco) gemischt. Die beiden Ansätze wurden 5 min bei RT inkubiert und dann vereinigt. Dieser Transfektions-Cocktail wurde weitere 20 min bei RT inkubiert und zu den Zellen gegeben. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel.

### **3.2.6.2 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Effectene<sup>TM</sup>**

Bei einer Transfektion mit Effectene<sup>TM</sup> (Qiagen, Hilden) wurden die Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion in einer T25-Flasche eine Konfluenz von 50-80% erreicht hatten. Für die Transfektion wurden zunächst die Transfektionskomplexe hergestellt. Hierfür wurden 4 µg Plasmid-DNA in 150 µl EC-Puffer vorgelegt. 32 µl Enhancer wurden hinzugefügt und vermischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden 40 µl Effectene zugesetzt. Der Transfektions-Cocktail wurde gut gemischt und inkubierte weitere 10 min bei RT. Zwischenzeitlich wurden die zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen und 4 ml Kulturmedium zugegeben. Abschließend wurde das Transfektions-Gemisch mit 1 ml Medium versetzt und vorsichtig auf die Zellen getropft. Das Medium wurde nach 6 h Inkubation gewechselt.

### **3.2.6.3 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Fugene<sup>®</sup>HD**

Für eine Transfektion mit Fugene<sup>®</sup>HD (Roche, Mannheim) wurden Zellen einen Tag zuvor mit geeigneter Zellzahl in T25-Kulturflaschen ausgesät, so dass am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 60-80% erreicht war. 2 µg Plasmid-DNA wurden in 100 µl serumfreiem OptiMEM (Gibco) vorgelegt und mit 10 µl Fugene<sup>®</sup>HD gemischt. Der Transfektions-Cocktail inkubierte für 15 min bei RT und wurde dann tropfenweise zu den Zellen gegeben, die zuvor mit PBS gewaschen und 4 ml Medium versehen wurden. Nach 6-8 h erfolgte ein Mediumwechsel.

### **3.2.7 Retroviraler Gentransfer**

Für die Durchführung eines retroviralen Gentransfers in die Zielzellen NIH3T3 wurden zunächst ψNX-eco-Verpackungszellen unter Verwendung von Effectene<sup>TM</sup> (Qiagen) transient transfiziert (siehe 3.2.6.2.) Von den ψNX-eco-Zellen produzierte und in den Zellkulturüberstand abgegebene retrovirale Partikel enthalten das

Transgen. Der Überstand wurde 48 h nach der Transfektion abgenommen und für 5 min bei 500 g zentrifugiert, um störende Zellen und Zelltrümmer zu pelletieren. Unter Verwendung eines Nitrozellulosefilters mit 0,45 µm Porengröße wurde der geklärte retrovirale Überstand anschließend sterilfiltriert und entweder direkt für die Infektion der Zielzellen verwendet oder bei -80°C gelagert.

Einen Tag vor der Infektion wurden  $2 \times 10^5$  NIH3T3-Zellen in einer T25-Zellkulturflasche oder einer 6-cm-Zellkulturschale ausgesät. Der Infektionscocktail wurde aus 1 ml retroviralem Überstand, 1 ml DMEM und 2 µl Polybrene (1000x Stammlösung) zusammengesetzt. Dieser Cocktail wurde tropfenweise auf die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Die Inkubation der Zellen mit dem Cocktail erfolgte für 6-8 h oder ü.N., danach wurde der Cocktail durch Medium ersetzt. Die stabile Expression des Transgens wurde nach 48 h untersucht.

### **3.2.8 Tet-On Genexpressions-System**

Als Modellsystem für eine induzierbare Genexpression wurde die MCF-7 Tet-On Zelllinie von Clontech (Mountain View, USA) verwendet. Diese Zellen wurden vom Anbieter bereits stabil mit dem pUHD17-neo-Plasmid transfiziert und exprimieren den reversen Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (rtTA). Die MCF-7 Tet-On Zellen wurden in DMEM mit 10% Tetrazyklin-freiem FCS (Clontech), 2 mM Glutamin (Gibco) und 0,25 mg/ml Geneticin (Calbiochem) kultiviert.

#### **3.2.8.1 Stabile Transfektion der MCF-7 Tet-On Zellen**

Durch eine zweite stabile Transfektion der MCF-7 Tet-On Zellen mit Fugene<sup>®</sup>HD (Roche) wurde das pTRE-Tight-Plasmid (Clontech) in die Zellen eingebracht, welches das Epitop-markierte Gen von Interesse unter Kontrolle des *Tet Response Elements* (TRE) exprimiert. Die Selektion der doppelt-transfizierten Zellen erfolgte mit 0,25 µg/ml Puromycin (Calbiochem) im Medium. Die isolierten Klone wurden mit 0,25 mg/ml Geneticin und 0,1 µg/ml Puromycin im Medium auf mehrere T25-Kulturflaschen expandiert, kryokonserviert und hinsichtlich der induzierbaren Expression des Transgens untersucht.

### **3.2.8.2 Induktion der Genexpression durch Doxyzyklin**

Die Zellen wurden einen Tag vor der Induktion je nach Fragestellung in T25 oder T75-Zellkulturschalen ausgesät. Hatten die Zellen eine Konfluenz von mindestens 50% erreicht, wurde das Medium mit 0.05-1µg/ml Doxyzyklin (Sigma) supplementiert. Doxyzyklin ist ein Tetrazyklin-Derivat und vermittelt im Komplex mit dem reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator die Bindung an das Tet-Response Element, wodurch die Expression des Transgens induziert wird. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und Proteinlysate hergestellt, um die Expression des Transgens mittels Western Blot Analyse zu untersuchen oder Gesamt-RNA isoliert, um eine PCR Analyse durchzuführen.

### **3.2.9 Bestimmung der Zellproliferationsrate**

Zur Bestimmung der Proliferationszeit bzw. Generationszeit von Zellen wurde ihr Teilungsverhalten über einen Zeitraum von insgesamt 6 Tagen analysiert. Am Tag 0 wurden für jeden weiteren Zeitwert jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen im Triplikat in 6-cm-Schalen ausgesetzt und die Zellzahlen nach 2, 4 und 6 Tagen bestimmt. Dazu wurden die Zellen zu einer Einzelzellsuspension trypsiniert, im entsprechenden Volumen resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Anhand der erhobenen Daten wurde eine Wachstumskurve erstellt, und aus deren Verlauf wiederum die Generationszeit der Zellen ermittelt.

### **3.2.10 Fokus-Assay**

Für die Durchführung des Fokus-Assays wurden  $5 \times 10^5$  NIH3T3-Zellen in einer 10-cm-Kulturschale ausgesät und einen Tag später mit retroviralem Überstand infiziert (siehe 3.2.7). Nachdem die infizierten Zellen 100%-ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie für weitere 14 Tage kultiviert. Während dieser Zeit wurde zweimal wöchentlich das Zellkulturmedium gewechselt. Zur Beurteilung einer veränderten Morphologie wurden die transformierten NIH3T3-Zellen bei 40-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop begutachtet und mit der parentalen Zelllinie verglichen.

### 3.2.11 Soft-Agar Assay

Zum Nachweis des Verankerungs-unabhängigen Wachstums transformierter NIH3T3-Zellen wurden Soft-Agar-Assays durchgeführt. Zunächst wurde unter semisterilen Bedingungen eine 5%-ige Agar-Stammlösung aus Agar Noble (BD Biosciences, Heidelberg) in H<sub>2</sub>O hergestellt. Zur Homogenisierung des Agars wurde die Lösung für 30 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Agarlösung auf 45°C abgekühlt und zur Verarbeitung auf dieser Temperatur im Wasserbad gehalten. Für die Herstellung der Agar-Böden wurde eine 0.5%-ige Lösung aus der 5%-igen Agar-Stammlösung und 45°C warmen H<sub>2</sub>O hergestellt und gründlich vermischt. Jeweils 7 ml der noch warmen Lösung wurden in 6-cm-Kulturschalen gefüllt. Die restliche Lösung wurde zur späteren Verwendung weiter bei 45°C im Wasserbad aufbewahrt. Bis zur Polymerisierung wurden die Agar-Böden für ca. 1 h bei RT inkubiert. Die zu untersuchenden Zellen wurden trypsiniert und gezählt. Jeweils  $4 \times 10^4$  Zellen wurden in 2 ml DMEM aufgenommen und mit 4 ml der 0,5%-igen Agarlösung vermischt. Jeweils 1,5 ml dieser Zellsuspension wurden auf einen Agar-Boden gegeben. Zur Polymerisierung der oberen Agar-Schicht wurden die Kulturschalen für 30 min bei RT inkubiert. Ein- bis zweimal wöchentlich wurde 1 ml Medium auf die Zellen gegeben. Die Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse erfolgte 21 Tage nach Versuchsbeginn am Durchlichtmikroskop mit Kamera (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar).

### 3.2.12 Implantation von Zellen in immundefiziente Mäuse

Die Tierversuche wurden unter der Nummer 29/07 vom Hamburger Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt und in Kooperation mit dem Institut für Anatomie II des Universitätsklinikums Eppendorf durchgeführt. Die zu implantierenden Zellen wurden wie unter 3.2.4 beschrieben in Kultur genommen und zweimal vor der Implantation passagiert. Am Tag der Implantation wurde aus den kultivierten Zellen eine Einzelzellsuspension in serumfreiem Medium hergestellt. Die Zellsuspension wurde auf  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt und bis zur Implantation auf Eis gehalten. Die Implantation von 200 µl der Zellsuspension, was  $1 \times 10^6$  Zellen entsprach, erfolgte subkutan zwischen die Schulterblätter der Mäuse. Für den Versuch wurden weibliche Nacktmäuse (Stamm: NMRI) verwendet, die bei Versuchsbeginn sieben Wochen alt waren. Die Begutachtung der Mäuse

erfolgte dreimal wöchentlich. Als Tag des beginnenden Tumorwachstums wurde der Tag definiert, an dem die Tumoren erstmals äußerlich sichtbar waren. Die Terminierung der Mäuse erfolgte bei einer Tumorgroße von 1 cm<sup>3</sup> durch Betäubung in CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre und Genickbruch. Nach 19 Tagen wurde der Versuch eingestellt. Alle noch verbliebenen tumorfreien Tiere wurden nach 70 Tagen terminiert.

### **3.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.3.1 Kultivierung von *E.coli***

##### **3.3.1.1 Bakterienstämme**

Für Transformationsexperimente und zur Vermehrung von Plasmiden wurden die *E.coli* Bakterienstämme DH5 $\alpha$  und TOP10F' von Invitrogen verwendet. Eine ausführliche Beschreibung der relevanten Geno- und Phänotypen dieser Organismen ist dem jeweiligen Handbuch des Herstellers zu entnehmen. Zur IPTG-induzierten Genexpression wurde der Stamm BL21-CodonPlus<sup>®</sup> (DE3)-RIPL von Stratagene (Heidelberg) eingesetzt. Angaben zum Geno- und Phänotyp sind dem Handbuch „BL21-CodonPlus<sup>®</sup> Competent Cells“ des Herstellers zu entnehmen.

##### **3.3.1.2 Vermehrung von *E.coli***

###### LB-Medium (pH 7,5):

1% (w/v) Bacto-Trypton (BD Biosciences)

0,5% (w/v) Hefeextrakt (BD Biosciences)

1% (w/v) NaCl

Zusatz für feste Nährböden:

1,5% (w/v) Bacto-Agar (BD Biosciences)

###### Ampicillin (Sigma):

Stammlösung: 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O

Endkonzentration: 100  $\mu$ g/ml

###### Kanamycin (Roth):

Stammlösung: 100 mg/ml

Endkonzentration: 25  $\mu$ g/ml

Für die Herstellung von festen Nährböden wurde dem autoklavierten LB-Medium nach Abkühlen auf ca. 55°C je nach Selektionsanforderung des Plasmids das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Antibiotikahaltige Platten wurden bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert.

Zur Vermehrung von *E.coli* wurde eine 5 ml Vorkultur (LB-Medium) mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in einem Inkubationsschüttler bei 37°C und 220 U/min ü .N.

### 3.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien

<u>Lösung 1</u>		<u>Lösung 2</u>	
30 mM	Kaliumacetat	10 mM	Na-MOPS
50 mM	MnCl <sub>2</sub>	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
100 mM	KCl	10 mM	KCl
10 mM	CaCl <sub>2</sub>	15% (w/v)	Glycerol
15% (w/v)	Glycerol	pH 7,0	
pH 5,8			

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 5 ml LB-Medium mit *E.coli* DH5α inokuliert und über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden mit diesem Ansatz 100 ml LB-Medium für eine erneute Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,6 bis 0,8 kultiviert und dann sedimentiert (6000 g; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 ml eiskalter Lösung 1 resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut sedimentiert (6000 g; 10 min; 4°C) und das Pellet in 4 ml Lösung 2 resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert (à 50 µl) und bei -80°C gelagert.

### 3.3.3 Transformation von *E.coli*

50 µl transformationskompetente Bakterien (3.3.2) wurden auf Eis aufgetaut und mit <0,1 µg Plasmid-DNA in TE-Puffer versetzt. Die Zellsuspension inkubierte 30 min auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz im Wasserbad für 30-60 sec auf 42°C erwärmt und nach 2 min auf Eis mit 450 µl LB-Medium (3.3.1.2) aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C und 220 U/min im Inkubationsschüttler

wurden die transformierten Bakterien in unterschiedlichen Verdünnungen auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um nachfolgend das Zellwachstum zu verlangsamen und die Plasmidstabilität zu gewährleisten, wurden die Kulturplatten bis zum Animpfen von Flüssigkulturen bei 4°C gelagert

#### **3.3.4 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Miniprep)**

5 ml LB-Medium plus Antibiotikum wurden mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zur Präparation der DNA wurden 2 ml der Übernachts-Bakterienkultur mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen den Herstellerangaben entsprechend aufgearbeitet. In 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) eluierte DNA wurde durch Restriktionsverdau charakterisiert oder bei -20°C gelagert.

#### **3.3.5 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Maxiprep)**

100 ml LB-Medium plus Antibiotikum wurden mit 10 µl einer Vorkultur beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde in 200 µl TE (pH 8,0) aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug im Allgemeinen 300-800 µg.

#### **3.3.6 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA**

Konzentration und Reinheitsgrad von DNA-Präparationen wurden durch Messung der  $OD_{260}$  bzw.  $OD_{260}/OD_{280}$  bestimmt. Hierbei gilt, dass eine  $OD_{260}$  von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht. Der Reinheitsgrad der untersuchten Proben lässt sich durch die Ermittlung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  beurteilen. Für nachfolgende Arbeiten wurden nur Plasmidpräparationen verwendet, deren Quotient mindestens 1,8 betrug.

#### **3.3.7 Restriktionsverdau**

Alle Restriktionsenzyme und dazugehörige Reaktionspuffer wurden von der Firma New England BioLabs (Frankfurt/Main) bezogen. Restriktionsspaltungen wurden

bei 37°C für 2-6 h durchgeführt. Die DNA-Konzentration im Ansatz betrug maximal 0,5 µg/µl. Das Enzym wurde im Überschuss (3-5 U/µg DNA) eingesetzt, wobei eine Glycerolkonzentration von 5% nicht überschritten wurde.

### 3.3.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Die Behandlung mit alkalischer Phosphatase verhindert die Eigenligation von gespaltener Plasmid-DNA durch die Entfernung der terminalen 5'-Phosphatgruppen. Nach dem Restriktionsverdau von 2 µg Vektor-DNA in einem 60 µl Reaktionsansatz wurden 1,5 µl Antarctic Phosphatase (5 U/µl; New England BioLabs) und 7 µl 10x Antarctic Phosphatase-Reaktionspuffer zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden erneut 1,5 µl Phosphatase zugegeben und die Inkubation für weitere 30 min fortgesetzt. Die geschnittene und dephosphorylierte Vektor-DNA wurde mit DNA-Probenpuffer (siehe 3.3.9) versetzt und elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt (siehe 3.3.9). Die DNA wurde aus dem Gel extrahiert (siehe 3.3.10) und direkt im Anschluss für eine Ligationsreaktion eingesetzt (siehe 3.3.11) oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Bei einer gerichteten Klonierung mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen konnte auf die Dephosphorylierung der Plasmid-DNA verzichtet werden.

### 3.3.9 Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren

#### TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat  
1 mM EDTA  
1% (v/v) Essigsäure  
pH 8,3

#### TBE-Puffer

89 mM Borsäure  
89 mM Tris-HCl  
2 mM Na<sub>2</sub>EDTA × 2H<sub>2</sub>O  
pH 8,0

#### DNA-Probenpuffer

50% (v/v) Glycerol  
1 mM EDTA  
0,4% (w/v) Bromphenolblau  
0,4% (w/v) Xylencyanol  
pH 8,0

Die Agarose-Gelelektrophorese von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgte in horizontalen Elektrophorese-Apparaturen (ComPor L Mini; Bioplastics RV, Landgraaf, NL). Für analytische Gele wurden TBE-Gele und für präparative Zwecke TAE-Gele verwendet. Die Auftrennung erfolgte je nach Größe der DNA-Fragmente in 1-2%-igen Agarose-Gelen (Lonza; Basel, Schweiz), denen vor der Polymerisierung 2‰ (v/v) Ethidiumbromid zur späteren Visualisierung der DNA zugesetzt wurde. Die polymerisierten Gele wurden mit Laufpuffer überschichtet und mit Proben beladen, die zuvor mit  $\frac{1}{10}$  Volumen DNA-Probenpuffer gemischt wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 70-100 V. Die Auswertung und Dokumentation der Gele erfolgte mit der „Gene Genius 2“ Geldokumentationsanlage (Syngene, Cambridge, UK) und zugehöriger Software.

### **3.3.10 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen**

Zu klonierende cDNA-Fragmente wurden nach Restriktionsverdau (siehe 3.3.7) im Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) isoliert. Dazu wurde unter UV-Licht (UV Transilluminator, Syngene) die entsprechende Bande aus dem Gel geschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei maximaler Drehzahl in der Eppendorf Zentrifuge 5417R durchgeführt. Die DNA wurde mit 30 µl EB-Puffer (10 mM Tris, pH 8,5) eluiert und direkt für die Ligation (siehe 3.3.11) verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.3.11 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von Vektor- und Insert-DNA erfolgte mit Hilfe der T4-DNA Ligase (New England BioLabs). Das Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA betrug ungefähr 1:3. Zur Begünstigung der intermolekularen Ligationen wurden hohe DNA-Konzentrationen (100 ng/µl) eingesetzt. Insert- und Vektor-DNA wurden mit 1 µl T4-DNA Ligase (400 U/µl) und 1 µl des entsprechenden 10x Reaktionspuffers versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Ansatz inkubierte für 16 h bei 16°C. Die Vermehrung des rekombinanten Plasmids erfolgte durch Transformation von Bakterien mit dem Ligationsansatz (siehe 3.3.3).

### 3.3.12 Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen

Die Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen wurde mit Hilfe des DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden subkonfluente Zellen aus einer T25-Zellkulturflasche verwendet. Um die Gesamtausbeute zu steigern, wurde die Elution der DNA in einem Volumen von 100 µl zweimal durchgeführt. Der DNA-Gehalt und die DNA-Reinheit wurden durch Messung der OD<sub>260</sub> bzw. OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> bestimmt. Die durchschnittliche Ausbeute betrug hierbei rund 1 µg DNA.

### 3.3.13 Isolierung von Gesamt-RNA

Ausgehend von einem Zellmaterial einer subkonfluenten T75-Zellkulturflasche erfolgte die Isolierung von Gesamt-RNA mit dem TRIZOL<sup>®</sup>-Reagenz (Invitrogen). Die Zellen wurden pelletiert, in 2 ml TRIZOL<sup>®</sup> aufgenommen, homogenisiert und gleichmäßig auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Die Proben inkubierten ca. 5 min bei RT und wurden dann mit jeweils 200 µl Chloroform versetzt. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei RT folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 12000 g. Hierbei kam es zur Phasentrennung von organischem Zellmaterial und wasserlöslichen Substanzen. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml kaltem Isopropanol gemischt, um die RNA zu präzipitieren. Nach 15 min Inkubation bei RT folgte eine Zentrifugation bei 12000 g, 4°C für 10 Minuten um die RNA zu sedimentieren. Das erhaltene RNA-Pellet wurde für 30 min mit 1 ml 75% Ethanol inkubiert, was dem Herauslösen von verunreinigenden Salzen diente. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen. RNA-Konzentration und -Reinheit wurden am Photometer bestimmt und die Proben bei -80°C gelagert.

### 3.3.14 Erststrang-cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA aus mRNA wurden die Reagenzien des SuperScript<sup>®</sup> First-Strand Synthesis Systems (Invitrogen) verwendet. Die hier eingesetzten Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer hybridisieren mit poly(A)-Überhängen der mRNA-Moleküle, die somit als Matrize für die reverse Transkriptionsreaktion dienen. 1-3 µg Gesamt-RNA (siehe 3.3.13) in 8 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O wurden mit 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primern (0,5 µg) gemischt, für 5 min bei 65°C

denaturiert und anschließend sofort für 1 min auf Eis abgekühlt. Dem RNA-Nukleotid-Gemisch wurden 9 µl Reaktionslösung bestehend aus 2 µl 10x Reaktionspuffer, 4 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM), 2 µl DTT-Lösung (0,1 M) und 1 µl RNase Inhibitor (4 U/µl), zugesetzt. Nach Inkubation für 2 min bei 42°C wurde dem Ansatz 1 µl (200 U) SuperScript II RT hinzugefügt. Die Synthese-Reaktion erfolgte bei 42°C für 50 min und wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 min abgestoppt. Die cDNA wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.3.15 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Je nach Fragestellung wurden für die Amplifikation von DNA zwei unterschiedliche DNA-Polymerasen gewählt. Bei nachfolgender Klonierung der PCR-Fragmente in Expressionsplasmide wurde die PfuTurbo<sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase (Stratagene) verwendet. Diese Polymerase verfügt über eine sogenannte „*proof-reading*“-Aktivität, wodurch es zu einer deutlich verringerten Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden während der Synthese von DNA-Strängen kommt. Für ausschließlich analytische Zwecke wurde die Taq DNA Polymerase (Qiagen) verwendet. Diese Polymerase ist im Vergleich zur PfuTurbo<sup>®</sup> Polymerase weniger empfindlich gegenüber Verunreinigungen, verfügt aber kaum über eine „*proofreading*“-Aktivität.

#### **3.3.15.1 Amplifikation mit PfuTurbo<sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase**

Als Matrize für die Amplifikationsreaktion mit der PfuTurbo<sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase (Stratagene) wurde cDNA (siehe 3.3.14) oder 3-5 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die 50 µl-Reaktionsansätze wurden auf Eis angesetzt und enthielten: 5 µl DNA, 5 µl 10x PfuTurbo-Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs (10 mM; Promega, Mannheim), je 2 µl Primer (100 ng/µl), 2,5 µl DMSO, 31,5 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl PfuTurbo<sup>®</sup> Hotstart DNA-Polymerase (2,5 U/µl). Die Reaktion wurde im Flexigene-Thermocycler von Techne (Staffordshire, UK) durchgeführt und lief bei folgendem Programm ab:

Initiale Denaturierung	5 min	95°C	} 30 Zyklen
Denaturierung	1 min	95°C	
Primer-Annealing	1 min	58-65°C	
Primer-Extension	2 min/kb	72°C	
Auffüllreaktion	10 min	72°C	

Die Temperatur für das Primer-Annealing lag je nach Nukleotidsequenz der beiden Primer zwischen 58°C und 65°C. Die Dauer der Primer-Extension-Reaktion war abhängig von der Größe des Amplifikationsproduktes und betrug 2 min/1 kb. Nach insgesamt 30 durchlaufenen Programmzyklen schloss sich eine Auffüllreaktion der unfertigen Synthese-Produkte von 10 min bei 72°C an. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

### 3.3.15.2 Amplifikation mit Taq DNA Polymerase

Als Matrize für eine PCR-Analyse mit der Taq DNA Polymerase (Qiagen) wurden 5 µl cDNA, 3-5 ng Plasmid-DNA oder 100 ng genomische DNA eingesetzt. Die 50 µl-Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert und enthielten neben der DNA noch 5 µl 10x Qiagen PCR Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTPs (10 mM), je 2 µl Primer (100 ng/µl), 35 µl H<sub>2</sub>O und 0,5 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl). Die Amplifikationsreaktion lief mit dem unter 3.3.15.1 beschriebenen Programm ab. Die Extensionszeit betrug hier 1 min/1 kb. Üblicherweise umfasste das PCR-Programm 30 Zyklen, bei der Verwendung von genomischer DNA wurden 35 PCR-Zyklen durchlaufen.

### 3.3.16 Klonierung von PCR-Produkten

Sollten PCR-Produkte in Plasmidvektoren kloniert werden, wurden entsprechend synthetisierte Oligonukleotid-Primer (MWG, Köln) für die PCR-Amplifikation verwendet. Die Primer tragen an ihren 5'-Enden eine Guanidin (G)- und Cytosin (C)-reiche Schutzgruppe (z.B. GCGCATGGC). Dieser Sequenz folgt eine spezifische Erkennungssequenz für das zur Klonierung verwendete Restriktionsenzym. Am 3'-Ende der Oligonukleotid-Primer befindet sich die zur Zielsequenz komplementäre genspezifische DNA-Sequenz. Die GC-reichen Schutzgruppen des PCR-Amplikons verhindern ein Aufschmelzen der DNA während des folgenden Restriktionsverdau, so dass dieser mit hoher Effizienz erfolgen kann.

Die PCR-Reaktion erfolgte mit der PfuTurbo<sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase (siehe 3.3.15.1). Die PCR-Produkte wurden nach erfolgreicher Amplifikation mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (siehe 3.3.7). Anschließend wurden die DNA-Fragmente im Agarose-Gel aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und in den linearisierten Plasmidvektor ligiert (siehe 3.3.9 bis 3.3.11).

### 3.3.17 Zielgerichtete Mutagenese

Die Methode der zielgerichteten Mutagenese ermöglicht es, durch eine PCR-Reaktion Mutationen in Plasmide einzufügen. Für die Amplifikation des gesamten Plasmids werden zwei komplementäre Primer eingesetzt, welche die gewünschte Mutation tragen, so dass jeder neu synthetisierte DNA-Strang mutiert ist. Um unmutierte Plasmid-DNA aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, erfolgt eine Inkubation mit dem Restriktionsenzym DpnI. Dieses Enzym spaltet ausschließlich die in den Bakterien methylierte Template-DNA. Die so gewonnenen Plasmide mit eingeführter Mutation liegen noch linearisiert vor. Sie werden im Zuge der Transformation in *E.coli* durch bakterielle Ligase ligiert.

#### 3.3.17.1 Einbau der zielgerichteten Mutation durch PCR

Für eine Mutagenese-PCR enthielten die 50 µl-Reaktionsansätze neben 50 ng Template-DNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer (Stratagene), 5 µl dNTPs (2 mM, Promega), je 1,25 µl Primer (100 ng/µl), das entsprechende Volumen H<sub>2</sub>O und 1 µl PfuTurbo<sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase (Stratagene; 2,5 U/µl). Die Mutagenese-PCR lief mit folgendem Amplifikationsprogramm ab:

Initiale Denaturierung	5 min	95°C	} 12 Zyklen
Denaturierung	30 sec	95°C	
Primer-Annealing	1 min	55°C	
Primer-Extension	1 min/kb	68°C	

Nach 12 Durchgängen des Amplifikationsprogramms wurde der Reaktionsansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Der Verdau der Template-DNA erfolgte durch Zugabe von 1 µl DpnI (New England Biolabs) und Inkubation für 1 h bei 37°C. Zur Vermeh-

Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde mit 1 µl des DpnI-verdauten Reaktionsansatzes für die Transformation des Bakterienstammes *E.coli* TOP10F' eingesetzt. Der korrekte Einbau der zielgerichteten Mutation wurde durch eine DNA-Sequenzanalyse überprüft (siehe 3.3.18).

### 3.3.18 Automatische DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Methode mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystem (Darmstadt) durchgeführt. Der vom Hersteller gelieferte BigDye-Mix enthält „FF“-Taq-Polymerase, Taq-Reaktionspuffer, dNTPs und die vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxy-NTPs.

Für einen 20 µl-Sequenzierungsansatz wurden 0,5 -1 µg DNA in maximal 11 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl Primer (3,2 pmol/µl) und 8 µl BigDye-Mix eingesetzt. Im Thermocycler (Techne) wurden 25 Zyklen des folgenden Programms durchlaufen:

Denaturierung	10 sec	96°C
Primer-Annealing	15 sec	50°C
Primer-Extension	4 min	60°C

Der Sequenzierungsansatz wurde anschließend mit 16 µl H<sub>2</sub>O versetzt und die DNA durch Zugabe von 64 µl 100% Ethanol für 30 min bei RT gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 4°C) und das Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA für 5-10 min bei RT getrocknet. Die Auftrennung der DNA auf einem Polyacrylamid-Gel und die weitere Detektion und Analyse der Sequenzierung erfolgte am Institut für Pathologie (UKE, Hamburg) mit dem Applied Biosystem DNA-Sequencer ABI PRISM (Modell 3100).

### 3.3.19 Qualitative mRNA-Analyse durch Northern-Blot-Hybridisierung

Mit Hilfe der Northern Blot Analyse können Größe und Menge einer spezifischen mRNA in einem heterogenen RNA-Gemisch ermittelt werden. Ein Vorteil gegenüber der quantitativen RT-PCR-Analyse besteht darin, dass unter Umständen auch verschiedene Spleißvarianten eines Primärtranskripts identifiziert werden können.

Die RNA wird zunächst gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembran immobilisiert. Der spezifische Nachweis der mRNA erfolgt mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde.

### **3.3.19.1 Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen**

#### FA Gelpuffer

20 mM MOPS

5 mM Natrium Acetat

1 mM EDTA (pH 7,0)

#### FA Laufpuffer

1x FA-Gelpuffer

2,5 M Formaldehyd

#### RNA Ladepuffer :

0.25% Bromphenolblau

4 mM EDTA

0,9 M Formaldehyd

20% Glycerol

30,1% Formamid

4x FA Gelpuffer

In der denaturierenden Gelelektrophorese wurden Gesamt-RNA-Proben (siehe 3.3.13) aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose in 10 ml 10x FA Gelpuffer und 100 ml Wasser durch Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Die Agarose-Lösung kühlte 10 min bei RT ab, wurde dann mit 1 µl Ethidium-Bromid-Lösung und 1,8 ml 37%-iger Formaldehyd-Lösung versetzt und anschließend in eine zuvor exakt austarierte Gelapparatur gegossen. Zur Herstellung der Taschen wurde ein 1 mm breiter Kamm benutzt. Das Gel polymerisierte für 45 min bei RT. Vor Beginn der Elektrophorese wurde das Gel 30 min mit kaltem Laufpuffer im Kühlraum bei 4°C äquilibriert. Parallel wurden die RNA-Proben vorbereitet. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min bei 68°C im Heizblock denaturiert und anschließend für mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Nun wurde der Kamm aus dem Gel gezogen und das Gel beladen. In ungenutzte Taschen wurde 1x Ladepuffer aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 80 V im Kühlraum. Nach 4 h wurde die Elektrophorese beendet, und es erfolgte die Dokumentation der RNA-Auftrennung.

### 3.3.19.2 RNA-Transfer auf Nylonmembran

#### Transferpuffer (20x SSC):

3 M NaCl

0,3 M Natrium Citrat

Sofort nach der Dokumentation der RNA-Auftrennung wurde das Gel für den folgenden Transfer zugeschnitten. Unbeladene Bahnen, sowie die Bereiche oberhalb der Probestaschen und unterhalb der Lauffront wurden abgetrennt und das Gel anschließend für 10 min bei RT in 200 ml Wasser geschwenkt. Zur partiellen Hydrolyse der RNA folgte eine Inkubation von 15 min in 200 ml 0,05 M NaOH. Anschließend wurde mit 200 ml 10x SSC-Puffer für 10 min neutralisiert. Der Transfer der RNA auf die Nylonmembran erfolgte im Kapillarblotverfahren. Zunächst wurden die Hybond N+-Nylonmembran (GE-Healthcare) und zwei Whatman-Filterpapiere auf die Größe des Gels zugeschnitten und in Transferpuffer äquilibriert. Eine 20 cm x 30 cm große Plastikwanne, befüllt mit Transferpuffer, diente als Pufferreservoir. Auf diese Wanne wurde eine Glasplatte gelegt, auf welcher eine in Transferpuffer getränkte Bahn Whatman-Filterpapier positioniert wurde, so dass die Enden des Papiers in das Pufferreservoir hineinragten (siehe Abb. 3.1). Das behandelte Gel wurde nun mit der Unterseite nach oben, zentral auf das Filterpapier gelegt. Das Gel wurde an den Seiten sorgfältig mit Frischhaltefolie umgeben, so dass der Strom des Transferpuffers ausschließlich durch das Gel geleitet wird.

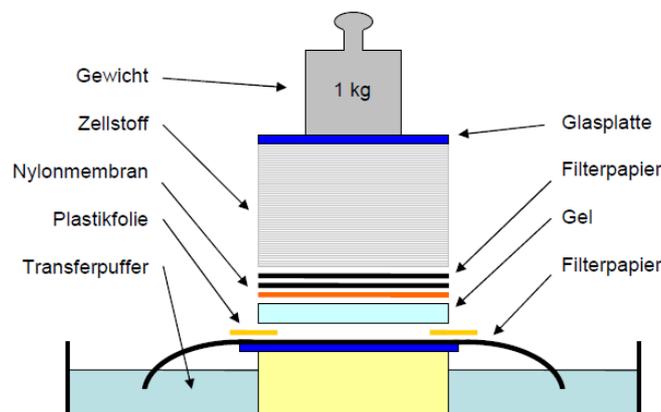


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau eines RNA-Transfer-Blots

Auf das Gel wurden zuerst die Membran und darauf folgend die zugeschnittenen und äquilibrierten Filterpapiere gelegt. Um eine Sogwirkung zu erzeugen, wurde auf die gestapelten Elemente ein 15 cm hoher Stapel Zellstoff gelegt. Auf den Zellstoff wurde eine weitere Glasplatte positioniert und mit einem Gewicht von etwa 1 kg beschwert. Der Transfer erfolgte ü.N. bei RT. Am nächsten Tag wurde die RNA mittels UV-Bestrahlung kovalent auf der Nylonmembran fixiert. Hierzu wurde das Auto-Crosslink-Programm des UV-Ofens (Techne) benutzt. Der Transfer der RNA wurde am Geldokumentationsgerät (Syngene) überprüft und dokumentiert. Zudem wurde die Lauffront der 18S- und 28S- RNA auf der Membran markiert. Zur weiteren Lagerung wurde die Membran mit H<sub>2</sub>O gewaschen und zwischen 2 Filterpapieren an einem dunklen Ort aufbewahrt.

### **3.3.19.3 Herstellung einer [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Sonde**

Zur spezifischen Detektion der RNA wurde eine radioaktiv markierte DNA-Sonde hergestellt. Diese Form des Nachweises bietet die höchstmögliche Sensitivität und ist aufgrund der direkten Markierung gut reproduzierbar.

Zur Herstellung der DNA-Sonden wurde das Rediprime II<sup>TM</sup>-Markierungssystem (GE-Healthcare) verwendet. Als DNA-Template dienten aufgereinigte cDNA-Inserts eines Expressionsplasmids. 25 ng DNA wurden in einem Volumen von 45  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen. Vor Beginn der Markierungsreaktion wurde die DNA 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Die Lösung wurde kurz abzentrifugiert und zum Rediprime<sup>TM</sup>-Reaktionsgemisch gegeben ohne dieses dabei zu durchmischen. Es folgte die Zugabe von 5  $\mu$ l des radioaktiv markierten [<sup>32</sup>P]dCTPs (50  $\mu$ Ci, GE-Healthcare). Nun wurde die Lösung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich durchmischt. Die Synthese der Sonden erfolgte für 30 min bei 37°C. Nach beendeter Synthese wurden nicht-inkorporierte Nukleotide mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Markierte DNA wurde zweimal sukzessiv mit je 50  $\mu$ l Elutionspuffer eluiert und die Cerenkow-Counts mit dem „easy-count“-Programm im Szintillations-Zähler (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bestimmt.

### 3.3.19.4 Hybridisierung einer DNA-Sonde mit immobilisierter RNA

#### Hoch-Stringenz-Waschpuffer

0,1x SSC

0,1% SDS

#### Niedrig-Stringenz-Waschpuffer

2x SSC

0,1% SDS

#### Hochsalz-Waschpuffer

5x SSC

0,5% SDS

Vor Beginn der Hybridisierung wurde die verwendete ULTRAhyb<sup>®</sup>-Hybridisierungslösung (Ambion, Darmstadt) im Brutschrank auf 68°C erwärmt, um vorhandene Präzipitate in Lösung zu bringen. Durchgeführt wurde die Hybridisierung in einem Hybridisierungsofen der Firma Techne. Die getrocknete Membran (siehe 3.3.19.2) wurde mit wenig Wasser befeuchtet und in eine Hybridisierungsflasche überführt, in die ebenfalls 10 ml der vorgewärmten Hybridisierungslösung gegeben wurden. Die Membran wurde für 60 min bei 42°C im Ofen prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurde pro Blot eine Radioaktivität von  $10^7$  cpm eingesetzt. Dies entsprach ca. 20 µl der markierten und aufgereinigten DNA-Sonde. Membran und Sonde inkubierten über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsofen. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgekippt, zweimal für 5 min bei 42°C mit niedrig-stringentem Waschpuffer und anschließend zweimal für 15 min bei 42°C mit hoch-stringentem Waschpuffer gewaschen. Nun erfolgte die erste Exposition eines Röntgenfilms für 2 h. Die Expositionszeiten wurden in Abhängigkeit vom erhaltenen Signal-Rausch-Verhältnis optimiert und die Membran gegebenenfalls weiteren Waschschritten unterzogen. Die zusätzlichen Waschschrritte wurden bei einer erhöhten Inkubationstemperatur von 60°C für jeweils 30 min mit Hochsalzwaschpuffer durchgeführt.

### 3.3.20 Erstellung und Auswertung von Expressionsprofilen mittels Mikroarray-Technologie

Unter Anwendung der Mikroarray-Technologie sollten Genexpressionsprofile von parental und CRB3A-überexprimierenden NIH3T3-Zellen erstellt und bezüglich ihrer Unterschiede analysiert werden. Als Plattform hierfür wurden *Whole Mouse Genome 4x44k* Mikroarrays von Agilent (St. Clara, Californien, USA) eingesetzt.

Ein solcher Array enthält mehr als 44 000 Oligonukleotide, die wiederum mehr als 41 000 bekannte Gene und Transkripte repräsentieren. Mit der technischen Durchführung der Mikroarray-Analyse und der anschließenden Auswertung der Rohdaten wurde die Firma Invivicon Diagnostics (Ochtrup) beauftragt.

### **3.3.20.1 Isolierung von Gesamt-RNA für Mikroarray-Analysen**

Zur Durchführung der Mikroarray-Analysen wurde aus beiden Zelllinien Gesamt-RNA von jeweils drei aufeinander folgenden Zellkultur-Passagen unter Verwendung des RNeasy<sup>®</sup> Kits (Qiagen) isoliert. Pro Array wurden 200 ng RNA eingesetzt.

### **3.3.20.2 Auswertung der Mikroarray-Rohdaten**

Die Rohdaten wurden zunächst mit der Agilent Feature Extraction Software hinsichtlich grober Unterschiede in der Signalverteilung untersucht. Die Normalisierung der Rohdaten erfolgte im Verfahren des „Median Scalings“. Die Werte für Gene, welche in mehreren Replikaten auf dem Array vertreten sind, wurden für weitere Analysen gemittelt. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede in den Genexpressionsprofilen der parentalen und CRB3A-überexprimierenden Zellen wurde der sog. SAM-Algorithmus (Significance Analysis of Microarrays) mit einer FDR (False Discovery Rate; Fehlerquote) von 5% angewendet. Gene, für die mindestens eine zweifache Deregulierung ermittelt wurde, gelten als signifikant dereguliert. Lag ihr Expressionsniveau unterhalb eines definierten Schwellenwertes, wurden die Gene als nicht-exprimiert eingestuft und von der Auswertung ausgeschlossen. Die Validierung der Daten wurde exemplarisch für einige Gene durch eine quantitative Realtime-PCR vorgenommen.

### **3.3.21 Quantitative Realtime-PCR**

Das Prinzip der *Realtime*-PCR beruht auf dem Einsatz von fluoreszierenden Reporterfarbstoffen, die eine Verfolgung der Reaktion in Echtzeit (engl. *realtime*) und eine Quantifizierung der eingesetzten DNA ermöglichen. Die Farbstoffmoleküle (SYBR-Green) werden unspezifisch in Doppelstrang-DNA eingebaut, was mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg führt, der sich proportional zur PCR-Produktmenge verhält.

Als Ausgangsmaterial für diese Analyse wurde Gesamt-RNA isoliert und mit dem RNeasy Kit (Qiagen) aufgereinigt. Für die cDNA-Synthese (3.3.14) wurde 1 µg der Gesamt-RNA eingesetzt. Statt Oligo(dT)-Primer wurden Random-Primer verwendet. Nach Abschluss der Synthesereaktion wurde die gewonnene cDNA im Verhältnis 1:20 mit H<sub>2</sub>O verdünnt.

Die Reaktionsansätze einer Realtime-PCR hatten ein Endvolumen von 20 µl und wurden stets im Triplet angefertigt. Pro Ansatz wurden 10 µl Quantitect<sup>®</sup>-SYBR-Green-Mastermix (Qiagen), jeweils 0,5 µl Primer (10 pm/µl) und 9 µl der verdünnten cDNA verwendet. Die Ansätze wurden zunächst in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen angesetzt und dann auf die twin.tec PCR-Platte (Eppendorf) übertragen. Durchgeführt wurde die PCR-Analyse mit dem realplex<sup>4</sup>-PCR-Gerät (Eppendorf). Das PCR-Programm startete mit 2 min bei 55°C, gefolgt von der initialen Denaturierung für 10 min bei 95°C. Dann wurden 40 Zyklen im Thermocycler durchlaufen:

Denaturierung	15 sec	95°C
Primer-Annealing	30 sec	58°C
Primer-Extension	30 sec	68°C

Es folgte ein Denaturierungsschritt von 15 sec bei 95°C. Danach wurden die Proben noch jeweils für 30 sec bei 60°C inkubiert. Das Programm endete mit einem über 20 min laufenden Anstieg der Temperatur auf 95°C. Mit Hilfe der realplex<sup>4</sup>-PCR-Software erfolgte die Auswertung der Rohdaten. Weitere Berechnungen wurden mit dem Microsoft-Excel-Programm vorgenommen.

### **3.3.21.1 Relative mRNA-Quantifizierung**

Zur Berechnung der relativen Genexpressionen auf Grundlage der aus der quantitativen PCR gewonnenen Daten wurde die  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode verwendet, wobei der CP-Wert (CP; Crossing Point) den PCR-Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz der neusynthetisierten DNA erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt.

Die Expression des Zielgens wird zunächst auf die Expression eines homogen exprimierten Referenzgens bezogen. Wichtig hierbei ist die gleiche Effizienz der

PCR-Reaktionen für Ziel- und Referenzgen. Als Referenzgen wurde Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) oder (RPL32) gewählt.

$$\Delta CP = CP_{\text{Zielgen}} - CP_{\text{Referenzgen}}$$

Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta CP$ -Wert der Proben (CRB3A) der  $\Delta CP$ -Wert der Kontrolle (parental) abgezogen:

$$\Delta\Delta CP = \Delta CP_{\text{CRB3A}} - \Delta CP_{\text{parental}}$$

Der relative Expressionsunterschied (Ratio) zwischen verschiedenen Proben normalisiert auf ein Referenzgen, ergibt sich aus der Formel

$$\text{Ratio} = 2^{\Delta\Delta CP}$$

Liegt der relative Expressionsunterschied unter 1, so ist das analysierte Gen in der Probe im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert, liegt er über 1, so ist das Gen heraufreguliert. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt und basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

### 3.4 Proteinchemische Methoden

#### 3.4.1 Herstellung polyklonaler Antiseren

Die Herstellung polyklonaler Antikörper erfolgte durch Peptid-Immunisierung von Kaninchen. Die Synthese der Peptide sowie die Immunisierung der Kaninchen erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma SIGMA Genosys Ltd (Havervill, UK). Den Peptiden wurde jeweils am N-Terminus ein zusätzlicher Cystein-Rest angefügt. Da die Peptide selbst nur schwach immunogen wirken, wurden sie über die Sulfhydrylgruppe des angehängten Cysteins kovalent an ein größeres Protein gekoppelt. Ferner erlaubt das angefügte Cystein eine spätere Kopplung des Peptids an eine Festphase, mit Hilfe derer die Peptid-spezifischen Antikörper aufgereinigt werden können. Vor der Immunisierung wurde den Kaninchen Primärserum abgenommen. Im Verlauf der Immunisierung wurden in regelmäßigen Abständen insgesamt 4 Testseren entnommen, anhand derer die Induktion und Zunahme der Immunantwort überprüft werden konnte. Nach beendeter

Herstellung der Antikörper im Kaninchen wurden Primärserum, Test-Seren und finales Serum hinsichtlich einer veränderten Reaktivität im Western Blot (siehe 3.4.3) verglichen. Wurde dabei eine spezifische Reaktivität des Serums festgestellt, erfolgte eine Affinitätsreinigung des polyklonalen Antikörpers.

### 3.4.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren

Bei einer affinitätschromatographischen Aufreinigung von Antiseren werden aus der Gesamtheit der in einem Antiserum vorhandenen Antikörper alle für ein bestimmtes Epitop spezifischen Antikörper aufgereinigt. Durch die Bindung der spezifischen, polyklonalen Antikörperpopulation an immobilisierte Peptide wird eine Abtrennung von allen anderen Bestandteilen des Antiserums erzielt. Überschüssiges und ungebundenes Material wird durch mehrfaches Waschen entfernt und die spezifischen Antikörper eluiert.

Die Durchführung der Antikörper-Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des SulfoLink<sup>®</sup> Kits von Pierce Biotechnology (Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers.

#### 3.4.2.1 Immobilisierung von Peptiden

##### Kopplungspuffer

50 mM Tris/HCl (pH 8,5)

5 mM Na-EDTA

##### Waschpuffer

1 M NaCl

0,05% Natriumazid

Für die Peptid-Kopplung an die Matrix wurden zunächst 2 mg Peptid in 2 ml Kopplungspuffer gelöst und für 15 min bei 4°C drehend inkubiert. Währenddessen wurde die mit Sulfo-Link<sup>®</sup>-Matrix befüllte Säule auf RT erwärmt, senkrecht in einem Stativ positioniert und die Lagerungslösung abgelassen. Die Matrix wurde zunächst mit 8 ml Kopplungspuffer äquilibriert und anschließend mit dem gelösten Peptid für 15 min bei RT unter Drehen inkubiert. Für weitere 30 min inkubierte die Säule in senkrechter Position. Sämtlicher Puffer wurde abgelassen und die Matrix mit 6 ml Kopplungspuffer gewaschen. Zur Blockierung ungenutzter Bindungsstellen an der Matrix wurde diese mit 15,8 mg L-Cystein, gelöst in 2 ml Kopplungspuffer, versetzt. Matrix und Cystein-Lösung wurden 15 min unter Drehen inkubiert. Anschließend wurde die Säule für 30 min aufrecht positioniert. Überschüssiges L-

Cystein wurde mit 12 ml Waschpuffer von der Matrix entfernt. Ein anschließender Waschschrift mit 12 ml Elutionspuffer diente dem Abtrennen von ungebundenem Peptid. Abschließend erfolgte ein Waschschrift mit 6 ml PBS. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Matrix mit 2 ml PBS überschichtet, die Säule abgedichtet und bei 4°C gelagert.

### 3.4.2.2 Immunaффinitätschromatographie

#### Elutionspuffer

0,1 M Glycin

1 M HCl (pH 2,5)

#### Neutralisationspuffer

1 M Natriumphosphat

1 M Tris/HCl (pH 8,5)

Die Inkubation des Serums mit der Matrix erfolgte im Batch-Verfahren. Hierfür wurde die Peptid-gekoppelte Matrix (siehe 3.4.2.1.) in 10 ml PBS resuspendiert, in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und in einer kurzen Zentrifugation sedimentiert. Das PBS wurde abgenommen und 10 ml des Immuserums zur Matrix gegeben. Serum und Matrix wurden ü.N. bei 4°C unter ständigem Mischen inkubiert. Für weitere Arbeitsschritte wurde die Suspension möglichst vollständig in eine Polyprep<sup>®</sup>-Säule überführt. Die Matrix wurde mit insgesamt 24 ml PBS gewaschen. Nun wurde jeweils 1 ml des Elutionspuffers auf die Matrix gegeben. Um eine Schädigung der eluierten Antikörper durch den sauren pH-Wert des Elutionspuffers zu vermeiden, wurden die eluierten Fraktionen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen gesammelt, in denen bereits 100 µl Neutralisationspuffer vorgelegt worden war. Die eluierte Antikörperlösung wurde sofort auf Eis gestellt. Es wurden insgesamt 10 Fraktionen gesammelt. Um die Fraktionen mit dem höchsten Antikörpergehalt zu ermitteln, wurden jeweils 10 µl der Eluate zu 100 µl Bradford-Reagenz (BioRad) gegeben, welches 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt war. Jeweils die beiden Eluate mit der höchsten Antikörperkonzentration wurden für die anschließende Dialyse vereint. Die Dialyse erfolgte unter Verwendung von Slide-A-Lizer<sup>®</sup>-Dialysekassetten (Perbio, Bonn) zweimal gegen 2 l PBS für 12-16 h bei 4°C. Der Antikörperlösung wurde Natriumazid zu einer Endkonzentration von 0,02% zugesetzt und bei 4°C gelagert.

### 3.4.3 Western Blot Analyse von Proteinen

Mit Hilfe der Western Blot Analyse können Proteine durch einen spezifischen Antikörper in einem komplexen Proteingemisch nachgewiesen werden. Hierfür werden die Proteine zunächst nach ihrer relativen Größe aufgetrennt und danach auf einer Trägermembran immobilisiert. Der spezifische Nachweis erfolgt anschließend mit einem Immunoblot. Je nach Fragestellung wurden die verwendeten Proteinlysate nach unterschiedlichen Extraktionsmethoden hergestellt.

#### 3.4.3.1 Herstellung von NP40-Gesamtzellextrakten

##### NP-40 Lysispuffer:

1% (w/v) Nonidet P-40 (Roche)

150 mM NaCl

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)

vor Gebrauch frisch zugesetzt : 1x Protease-Inhibitor (Roche)

2x	4x	Probenpuffer (nicht-reduzierend)
2% (w/v)	4% (w/v)	SDS
20% (w/v)	40% (w/v)	Glycerol
120 mM	240 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
0,01% (w/v)	0,02% (w/v)	Bromphenolblau

Für den Aufschluss der Zellen wurden diese im Zellkulturgefäß zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst und in max. 1 ml PBS aufgenommen. Nach Überführung der Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 U/min für 3 min. Überschüssiges PBS wurde entfernt, das Zellpellet in einem angemessenen Volumen NP40-Lysispuffer resuspendiert und für 20-30 min auf Eis inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 13.200 U/min für 10 min wurden Zellkerne und unlösliche Bestandteile abgetrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach Bradford (3.4.3.3). Abschließend wurde das Lysat mit entsprechendem Volumen 2x- oder 4x-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben lagerten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

### **3.4.3.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten mit SDS-Lysispuffer**

#### SDS-Lysispuffer:

2% (w/v) SDS

62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8)

10% (v/v) Glycerin

vor Gebrauch frisch zugesetzt: 1x Protease-Inhibitor (Roche)

Nach zweimaligem Waschen des Zellrasens mit PBS wurden die Zellen in einem Volumen von 1 ml PBS mit einem Zellschaber vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Nach Entfernung des überschüssigen PBS wurden die Zellen mit einem geeigneten Volumen SDS-Lysispuffer aufgeschlossen. Die Degradierung der DNA erfolgte durch Ultraschall-Behandlung. Hierzu wurde das Lysat in 2 Zyklen mit je 15 Impulsen bei einer Amplitude von 60% beschallt (Ultraschallprozessor, Fa. Dr. Hirschler, Bonn). Für die Proteinbestimmung nach der BCA-Methode (3.4.3.4) wurden 2 µl des Rohlysats eingesetzt. Dem Lysat wurden anschließend 0,5 µl einer mit Bromphenolblau gesättigten, ethanolischen Lösung zugesetzt. Die Probe wurden abschließend 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.4.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Proteinbestimmung wurde das kommerziell erhältliche Bradford-Reagenz der Firma BioRad (München) benutzt. Die zu messende Probe wurde mit 0,1 N NaOH zu einem Endvolumen von 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl Farbreagenz versetzt, gut durchmischt und für 15 min bei RT inkubiert. Als Leerwert diente ein Ansatz bestehend aus 800 µl 0,1 NaOH und 200 µl Farbreagenz. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 595 nm gegen den Leerwert im Photometer. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen vorgenommen.

Für die Erstellung einer Eichkurve, die den Bereich von 1-32 µg Protein abdeckte, wurde eine BSA-Stammlösung (1 mg/ml in 0,1 N NaOH) verwendet. Definierte Volumina der Stammlösung wurden mit entsprechenden Volumina 0,1 N NaOH und 200 µl Farbreagenz versetzt, 15 min bei RT inkubiert und im Photometer

gegen den Leerwert vermessen.

#### **3.4.3.4 Proteinbestimmung nach der BCA-Methode**

Zur Proteinbestimmung von SDS-Ganzzelllysaten (siehe 3.4.3.2) wurde das Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit (Perbio) benutzt. Hierzu wurde zunächst die Detektionslösung nach Angaben des Herstellers hergestellt. Für jede zu messende Probe wurden 200 µl Detektionsreagenz in einem 96-well vorgelegt. Anschließend wurden 2 µl des Proteinlysates hinzugefügt.

Für die Erstellung einer Eichgrade wurden im Duplikat je 2 µl einer BSA-Lösung mit definiertem Proteingehalt von 1 µg, 2 µg, 5 µg und 10 µg mit 200 µl der Detektionslösung vermischt. Die Proben wurden für 1 h bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 562 nm im Photometer (Eppendorf).

#### **3.4.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

##### Sammelgel (2 ml)

H <sub>2</sub> O	1,4 ml
30% Acrylamid	0,33 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	0,25 ml
10% (v/v) SDS	0,02 ml
10% (w/v) APS	0,02 ml
TEMED	0,004 ml

##### Trenngel (5 ml)

% Acrylamid	6%	12%	15%
H <sub>2</sub> O	2,6 ml	1,6 ml	2,0 ml
30% Acrylamid	1,0 ml	2,0 ml	1,6 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
10% (v/v) SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
10% (w/v) APS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml

Laempuffer (Laemmli):

192 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

25 mM Tris-HCl

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte durch eine denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [89]. Hierfür wurden zunächst die Polyacrylamidgele in Hoefer Dual Gel Caster Gießständen (Amersham Biosciences, Freiburg) angefertigt. Je nach Größe der zu analysierenden Proteine wurde ein Trenngel mit 6-15% Acrylamid-Gehalt hergestellt. Nach vollständiger Polymerisierung wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, in welches vor Einsetzen der Polymerisierung ein Probenaschen-Kamm eingelassen wurde. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde das Gel in eine Hoefer Minigelkammer Model SE250 (Amersham Biosciences) eingespannt und die Pufferreservoirs mit Laemmli-Laufpuffer befüllt. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Dabei werden die Proteine durch das im Probenpuffer enthaltene SDS mit einer zu ihrer Größe proportionalen Ladung versehen, was die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im Gel ermöglicht. Als Referenz für die Proteingröße wurde der Molekulargewichts-Standard "Full Range Rainbow RPN800" (Amersham Biosciences) mitgeführt. Die Gelelektrophorese lief bei 25 mA pro Gel für ca. 1 h. Der Nachweis gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine erfolgte entweder unspezifisch durch eine Coomassie-Färbung des Gels (siehe 3.4.3.6) oder spezifisch durch einen Immunoblot (siehe 3.4.3.9)

**3.4.3.6 Coomassie-Brilliant-Blue Färbung von Polyacrylamid-Gelen**Färbelösung

50% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

0,25% (w/v) Coomassie-Brilliant Blue R-250

Entfärbelösung

20% (v/v) Methanol

7,5% (v/v) Essigsäure

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine können in ihrer Gesamtheit durch eine irreversible Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue im Polyacrylamid-Gel nachgewiesen werden. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Sammelgel vom

Trenngel abgelöst und verworfen. Das Trenngel wurde in ausreichend Färbelösung überführt und hierin unter leichtem Schwenken für 1 h bei RT inkubiert. Die Färbelösung wurde durch das gleiche Volumen Entfärbelösung ersetzt, und das Gel über mehrere Stunden vollständig entfärbt. Fotografisch dokumentiert wurde das Gel mittels Scanner (Expression 1680 Pro, Epson).

### **3.4.3.7 Semidry-Transfer auf Nitrozellulose-und PVDF-Membranen**

#### Transferpuffer

48 mM	Tris-HCl
39 mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol
0,038% (v/v)	SDS

Für einen nachfolgenden Immunoblot wurden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch einen Elektrotransfer aus dem SDS-Gel auf eine Trägermembran zugänglich gemacht. Mittels der Trans-Blot SD Semidry-Blotapparatur (Bio-Rad) wurden die Proteine entweder auf eine Hybond ECL Nitrozellulose-Membran (Amersham Biosciences) oder auf eine Immobilon PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) transferiert. PVDF-Membranen zeichnen sich im Vergleich zu Nitrozellulose-Membranen durch eine größere Proteinbindungskapazität aus. Aufgrund ihrer hydrophoben Oberflächenbeschaffenheit müssen sie allerdings vor dem Transfer aktiviert werden. Dazu wurden die Membranen für 1 min in 100% Methanol inkubiert, dann für 3-5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend für 5-10 min in Transferpuffer äquilibriert. PVDF-Membranen wurden verwendet, wenn das zu untersuchende Protein in sehr geringer Konzentration im Lysat vorlag.

Für den Transfer wurden jeweils eine Membran und vier 3MM-Whatmann-Filter (VWR, Darmstadt) auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer inkubiert. Auf der Anodenseite der Blotapparatur wurde folgender Aufbau vorgenommen: auf zwei 3MM-Whatmann-Filter folgte die Nitrozellulose- oder PVDF-Membran, das Gel wurde aufgelegt und mit zwei 3MM-Whatmann-Filtern bedeckt. Nach Aufsetzen der Kathode erfolgte der Transfer mit 0,8 mA/cm<sup>2</sup> je nach Größe der zu transferierenden Proteine für 1-2 h.

### 3.4.3.8 Ponceau-S-Färbung von Proteinen

Durch reversibles Anfärben der Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran wurde der Elektrotransfer (siehe 3.4.3.7) anschließend überprüft. Dazu wurde die Membran 1 min in Ponceau-S-Lösung (Sigma) inkubiert, durch Waschen in H<sub>2</sub>O teilweise entfärbt und schließlich für den Immunoblot weiterverwendet.

### 3.4.3.9 Immunoblot-Analyse

#### PBS-Blotto

4% (w/v) Trockenmilchpulver, fettfrei

#### PBS-Tween

0,05% (v/v) Tween-20

#### ECL-Lösung 1

0,1 M Tris-HCl pH 8,5  
25 mM Luminol (Sigma)  
9 mM p-Cumarinsäure (Sigma)

#### ECL-Lösung 2

0,1 M Tris-HCl pH 8,5  
0,018% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

vor Gebrauch: Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 mischen.

Um unspezifische Bindungsstellen auf einer proteinbeladenen Membran zu blockieren, wurde diese für 30-60 min bei RT in PBS-Blotto geschwenkt. Der Filter wurde dann bei ständiger Rotation für 1-15 h mit dem Primärantikörper in geeigneter Verdünnung in PBS-Blotto inkubiert. Durch anschließendes mehrmaliges Waschen mit PBS-Tween wurden ungebundene, überschüssige Antikörper entfernt. Der entsprechende Meerrettichperoxidase-konjugierte Zweitantikörper wurde, wenn nicht anders angegeben, im Verhältnis 1:2000 in PBS-Blotto verdünnt und für 1-2 h bei RT auf die Membran gegeben. Anschließend wurde der Filter achtmal 5 min mit PBS-Tween gewaschen. Die Peroxidase-Substrat-Reaktion zur Visualisierung der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte durch eine 5-minütige Behandlung der Membran in der frisch präparierten ECL-Lösung (ECL, *Enhanced Chemiluminescence*). Anschließend erfolgte die Detektion durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fuji) für 10 sec bis 15 min und Entwicklung des Films im automatischen Filmentwickler (Hyperprocessor, Amersham Biosciences).

### 3.4.3.10 Entfernung der Antikörper von Nitrozellulosemembranen

#### „Stripping“-Puffer

100 mM 2-Mercaptoethanol  
 2% (v/v) SDS  
 62,5 mM Tris-HCl; pH 6,7

Um gebundene Primär- und Sekundär-Antikörper von einer Nitrozellulose-Membran zu entfernen, wurde diese zunächst für 15 min in PBS-Tween gewaschen und anschließend für 30 min bei 50°C in 10 ml „Stripping“-Puffer inkubiert. Vor einem erneuten Blockierungsschritt wurde die Membran zweimal für 15 min in PBS-Tween gewaschen.

### 3.4.4 Immunpräzipitation von FLAG-Fusionsproteinen

#### IP-Lysis-Puffer

150 mM NaCl  
 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
 1 mM EDTA  
 1% (v/v) Triton-X-100

#### IP-Waschpuffer

1,5 M NaCl  
 0,5 mM Tris-HCl (pH 7,4)

frisch vor Gebrauch: 1x Protease-Inhibitoren (Roche)

Die Aufreinigung von FLAG-Fusionsproteinen aus dem Gesamt-Zelllysate erfolgte mit Hilfe des ANTI-FLAG® M2 Affinitätsgels von Sigma. Hierbei handelt es sich um eine Agarose-Matrix, an die der murine, monoklonale Anti-FLAG-M2-Antikörper kovalent gekoppelt ist.

Zunächst wurden aus Zellen, welche FLAG-Fusionsproteine exprimierten, unter Verwendung des IP-Lysis-Puffers Gesamt-Zelllysate, wie unter 3.4.3.1 beschrieben, hergestellt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde nach der Bradford-Methode (3.4.3.3) bestimmt. Für die Immunpräzipitation (IP) wurden 1-2 mg Gesamtprotein eingesetzt. Jeweils 50 µl der entsprechend eingestellten Proteinlösungen wurden als Ladekontrolle entnommen, mit 2x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die verbliebenen 950 µl der Probe wurden für die IP verwendet. Hierfür wurden zunächst 100 µl des ANTI-FLAG® M2 Affinitätsgels durch 5 repetitive Waschschrte mit 1 ml Lysis-Puffer vorsichtig resuspendiert und für 1 min bei 2000 U/min, 4°C sedimentiert. Da das Gel als 50% „slurry“ vorlag,

resultierte daraus ein 50 µl Gelbett pro Ansatz, auf welches das Proteinlysate gegeben wurde. Die IP erfolgte ü.N. bei 4°C. Um ungebundene Proteine auszuwaschen wurde die Matrix anschließend in 5 Wiederholungen nach dem Verfahren der Äquilibrierung mit IP-Waschpuffer behandelt, wobei der Waschpuffer stets vollständig abgenommen wurde. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe eines gleichen Volumens 2x Probenpuffer und Erhitzen für 10 min bei 95°C. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Matrix für 1 min bei 10000 U/min sedimentiert, das überstehende Proteinlysate komplett abgenommen und für eine Western Blot Analyse (siehe 3.4.3) verwendet oder bei -20°C gelagert.

### **3.4.5 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen**

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurden zunächst Sequenzen des Gens von Interesse durch eine passende Klonierungsstrategie in den pGEX-2T-Vektor eingebracht, wodurch die N-terminale Fusion der Gluthation-S Transferase an das klonierte Genprodukt erzielt wurde. Da der pGEX-2T-Vektor einen Lac-Promotor trägt, kann die Expression der GST-Fusionsproteine durch Zugabe des Galactose-Derivats IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, Sigma) induziert werden.

#### **3.4.5.1 IPTG-induzierte Expression von GST-Fusionsproteinen in *E.coli***

Jeweils 50µl *E.coli* BL2-CodonPlus<sup>®</sup>(DE3)-RIPL von Stratagene wurden mit Plasmid-DNA transformiert (siehe 3.3.3), auf LB-Amp<sup>+</sup>-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die mit Kolonien bewachsenen Platten wurden bis zum Animpfen von 5 ml-Vorkulturen (LB-Medium mit Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin) bei 4°C gelagert. Nach 16 h Inkubation bei 37°C, 225 U/min wurden die 5 ml-Vorkulturen mit LB-Medium auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation zunächst für 1 h bei 37°C, 225 U/min und für weitere 1,5 h bei 37°C, 110 U/min. Von der Bakterienkultur wurden 500 µl als Kontrolle entnommen, pelletiert, in 100 µl 1x Probenpuffer resuspendiert und nach Denaturierung bei -20°C gelagert. Die Induktion durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) erfolgte für 4,5 h bei 37°C, 225 U/min. Erneut wurden 500 µl der Bakterienkultur zur späteren Kontrolle der induzierten Expression von GST-Fusionsproteinen entnommen. Die 50 ml-Bakterienkultur wurde für 30 min bei 5850 U/min, 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde zweimal mit

10 ml PBS/1% Tx-100 gewaschen und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

#### **3.4.5.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen**

Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte unter Verwendung der Glutathion-Sepharose 4B von GE Healthcare und wurde nach Angaben des Herstellers im Batch-Verfahren durchgeführt. Jeweils 2 ml 50%-„slurry“ Glutathion-Sepharose wurden in 15 ml-Falcon-Gefäße überführt und dreimal durch Resuspendieren in je 10 ml PBS mit anschließendem Sedimentieren für 3 min bei 2000 U/min gewaschen. In PBS äquilibrierte Affinitätsmatrix wurde bis zur Inkubation mit Proteinlysat bei 4°C aufbewahrt.

Auf Eis lagernd aufgetaute Bakterienpellets wurden in 18 ml PBS/1% Tx-100 resuspendiert und in drei Portionen à 6 ml auf 15 ml-Gefäße verteilt. Die Bakterien-suspension wurde zum Zellaufschluss einer Ultraschall-Behandlung (3 Zyklen, je 10 Impulse, max. Amplitude) unterzogen, wobei die Proben auf Eis lagerten. Anschließend wurden die Lysate auf 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 30 min, 13200 U/min, 4°C pelletiert. Die Überstände wurden zum Rohlysat vereinigt. Als Kontrolle wurden 100 µl Rohlysat entnommen und wie unter 3.4.7.2 beschrieben aufgearbeitet. Jeweils 12 ml Rohlysat wurden für die Kopplung der GST-Proteine an die Sepharose-Matrix eingesetzt. Die Inkubation erfolgte ü.N., 4°C auf dem Rollmischer. Vom Lysat-Matrix-Gemisch wurden 100 µl als Kontrolle entnommen. Durch Zentrifugation für 2 min bei 2000 U/min wurde die Matrix mit gebundenen GST-Fusionsproteinen pelletiert. Um ungebundene Proteine von der Matrix zu entfernen, folgten fünf repetitive Waschschriffe mit je 10 ml PBS/1% Tx-100 und Zentrifugation für 2 min bei 2000 U/min. Anschließend wurde die Matrix in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, um die GST-Fusionsproteine mit jeweils 500 µl 5 mM Glutathion/ 50mM Tris-HCl zu eluieren. Der Elutionsschritt wurde fünfmal wiederholt und die sechs Fraktionen à 500 µl zum Gesamt-Eluat (3 ml) vereinigt. Die finale Proteinkonzentration wurde nach Bradford (siehe 3.4.3.3) bestimmt. Um die Abtrennung der Proteine von der Matrix zu überprüfen, wurden 100 µl Sepharose nach der Elution entnommen. Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurden durch SDS-PAGE mit den entnommenen Kontrollen und jeweils einem 5 µl-Aliquot des Gesamt-Eluats und anschließender Coomassie-Färbung des Gels überprüft.

### 3.4.6 Cdc42/Rac1/2/3-Aktivierungsassay

Basierend auf der Tatsache, dass viele Rho-GTPase Effektorproteine spezifisch die aktivierte, GTP-gebundene, aber nicht die inaktive, GDP-gebundene Form von Cdc42 und Rac1/2/3 erkennen und komplexieren, kann mit einem Bindungsassay der Aktivierungsstatus der beiden GTPasen untersucht werden. Die als GST-Fusionsprotein exprimierte CRIB-Domäne (*Cdc42/Rac Interactive Binding Region*) des PAK1-Proteins (*p21 activated kinase 1*) wird als Bindungspartner für Cdc42 und Rac1/2/3 eingesetzt, um deren Aktivierungsstatus in verschiedenen Zelllinien zu analysieren. Das CRIB-Motiv bindet mit sehr hoher Affinität und spezifisch nur die GTP-gebundene Form der beiden Rho-GTPasen. Die Bindung resultiert zudem in einer verminderten Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP. Somit ist eine Aufreinigung bzw. ein „*Pulldown*“ von GTP-Cdc42 und GTP-Rac1/2/3 aus den Zellysaten möglich. Anhand einer nachfolgenden Western Blot Analyse können die präzipitierten Cdc42- und Rac1/2/3-Mengen verglichen werden.

#### 3.4.6.1 *Pulldown von GTP-Cdc42 und Rac1/2/3 mit GST-PAK1(CRIB)\**

\*: Das pGEX-2T-PAK1(CRIB)-Expressionsplasmid wurde freundlicherweise von Prof. Äpfelbacher (Institut für Mikrobiologie, UKE Hamburg) zur Verfügung gestellt.

##### PD-Lysis-Puffer

150 mM NaCl  
 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,1 mM Natriumdeoxycholat  
 0,1% (v/v) SDS  
 1% (v/v) Triton X-100

##### PD-Waschpuffer

150 mM NaCl  
 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1% (v/v) Triton X-100

frisch vor Gebrauch: 1x Protease-Inhibitoren (Roche)

Zur Durchführung des Cdc42/Rac1/2/3-Aktivierungsassays wurden pro Ansatz je 20 µg GST-PAK1-CRIB bzw. GST-Protein an Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) gekoppelt. Hierfür wurden jeweils 100 µl der als 50% „*slurry*“ vorliegenden Matrix in PBS äquilibriert und mit GST-Proteinen in 200 µl PBS für 2 h bei 4°C inkubiert. Um ungebundene GST-Proteine zu entfernen, wurde dreimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen und 1 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Während der Herstellung der Proteinlysate lagerte die Matrix bei 4°C.

Zu analysierende Zellen wurden geerntet und mit 1 ml PD-Lysis-Puffer pro konfluenter T75-Zellkulturflasche aufgeschlossen. Die Zelllyse erfolgte für 10 min auf Eis, es folgte eine Zentrifugation für 10 min, 4°C bei 13.200 U/min. Der Überstand wurde in frische 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Konzentration des Proteinlysats wurde nach Bradford (siehe 3.4.3.3) ermittelt und durch Zugabe von PD-Lysis-Puffer auf 1 µg/µl eingestellt. Pro Ansatz wurden 0,5-1 mg Gesamtprotein mit 100 µM GDP oder dem nicht-hydrolysierbaren GTP-Derivat GMP-PNP (Sigma) versetzt und zum „*Pulldown*“ mit Sepharose-gekoppeltem GST-PAK1-CRIB oder GST-Protein ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Matrix wurde dreimal vorsichtig mit je 1 ml PD-Waschpuffer resuspendiert und 1 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch Erhitzen der Matrix in 50 µl 2x Probenpuffer für 10 min bei 95°C mit anschließender Inkubation auf Eis. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation bei 5000 U/min sedimentiert, der Überstand quantitativ abgenommen und für eine nachfolgende Western Blot Analyse verwendet.

### **3.4.7 Tunikamycin-induzierte Inhibition der N-Glykosylierung**

Tunikamycin ist ein Gemisch aus mehreren Nukleosid-Antibiotika und fungiert als Inhibitor von bakteriellen und eukaryontischen N-Acetylglucosamin-Transferasen. Der erste Schritt in der N-Glykosylierung, die Anheftung von N-Acetylglucosamin an Dolicholphosphat, wird hierdurch unterbunden. Aufgrund dieser Wirkung wird Tunikamycin zur Analyse der N-Glykosylierung von neusynthetisierten Proteinen eingesetzt.

Die Tunikamycin-Stocklösung enthielt 1 mg/ml Tunikamycin (Sigma) in DMSO. Die zu untersuchenden Zellen wurden in 6-well-Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 50%-60% im entsprechenden Medium kultiviert. Für die Tunikamycin-Behandlung wurde das Kulturmedium gegen Medium ausgetauscht, welches 0,1-10 µg/ml Tunikamycin enthielt. Die Zellen wurden für weitere 24 h im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle wurden parallel Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO (0,1-10 µl DMSO/ml Medium) kultiviert. Eine veränderte Glykosylierung des Zielproteins wurde mittels Western Blot analysiert.

### 3.4.8 Inhibition der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation

Der proteasomale Abbau von Ubiquitin-konjugierten Proteinen kann durch das Reagenz MG-132 (Calbiochem) gezielt inhibiert werden, was zur Akkumulation der entsprechenden Proteine innerhalb der Zellen führt. Auf diese Weise können Rückschlüsse auf die Stabilität von Proteinen gezogen werden.

Für die Behandlung mit MG-132 über einen Zeitraum von 2 h bis 16 h wurden pro Zeitwert jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen in T25-Kulturflaschen ausgesät. Nach Erreichen einer 80-90% Konfluenz wurde eine Flasche unbehandelter Zellen als Kontrolle geerntet, und somit der Zeitpunkt  $T_0$  markiert. Bei den verbliebenen Zellkulturflaschen wurden das Medium gegen ein mit 10  $\mu$ M MG-132 (10 mM Stock in DMSO) versetztes Medium ausgetauscht. Nach jeweils 2 h, 4 h, 8 h, 12 h und 16 h Inkubation wurden die Zellen geerntet. Parallel zu jedem Zeitwert wurden Zellen als Kontrollen geerntet, deren Medium mit 0,5% (v/v) DMSO versetzt war. Die inhibierte Degradation des Zielproteins wurde anschließend in einer Western Blot Analyse untersucht.

### 3.4.9 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen

Zellen wurden auf Vierkammer-Objektträgern (Nunc) ausgesät. Bei geeigneter Zelldichte wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen zweimal mit jeweils 750  $\mu$ l PBS gewaschen und anschließend mit 100% Methanol (-20°C) auf Eis für 10 min fixiert und permeabilisiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit jeweils 750  $\mu$ l PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen mit 1% (w/v) BSA/PBS für 30 min bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in geeigneter Verdünnung in 1% (w/v) BSA/PBS verdünnt und für 90 min bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen viermal mit 750  $\mu$ l PBS gewaschen. Die Inkubation mit sekundärem Antikörper (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 donkey anti-rabbit IgG) erfolgte bei einer Verdünnung von 1:200 in 1% (w/v) BSA/PBS für 90 min im Dunkeln. Die Zellen wurden nun dreimal mit 750  $\mu$ l PBS gewaschen. Zur unspezifischen Färbung der Zellkerne wurden jeweils 500  $\mu$ l einer 1:5000 in PBS verdünnten DAPI-Färbelösung auf die Zellen gegeben und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 750  $\mu$ l PBS gewaschen. Zur Entfernung der Plastikkammern von dem Objektträger wurden 500  $\mu$ l 70% Ethanol in die Kammern gefüllt und 10 min inkubiert. Dies führte zur

Auflösung des Klebstoffes, so dass die Plastikammern entfernt werden konnten. Die Zellen wurden abschließend in jeweils 30 µl Mowiol eingebettet und bis zur Auswertung an einem dunklen Ort gelagert. Die Färbung der Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop (Leica, Type DM LB) begutachtet und mit Hilfe einer an das Mikroskop gekoppelten Kamera dokumentiert. Mit dem digitalen Bildverarbeitungssystem KAPPA (KAPPA opto-electronics GmbH, Gleichen) wurden die Aufnahmen verwaltet und bearbeitet.

#### 3.4.9.1 Herstellung von Mowiol

Zur Herstellung von Mowiol Mounting Medium wurden 2,4 g Mowiol Typ 4-88 (Calbiochem) mit 6 ml Glycerol in einem 50 ml-Röhrchen verrührt, mit 6 ml H<sub>2</sub>O versetzt und 2 h auf einem Drehschüttler vermischt. Nach Zugabe von 12 ml 200 mM Tris-HCl (pH 8,5) wurde die Lösung für 10 min auf 50°C erwärmt und nach Abkühlung auf RT 15 min bei 5000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Vom Überstand wurden Mowiol-Aliquots à 500 µl angefertigt und bei -20°C gelagert.

#### 3.4.10 Immunhistochemische Färbung von Paraffin-Schnitten und TMAs

Anhand von immunhistochemischen Färbungen wurden Untersuchungen zu Proteinexpressionen im Gewebe angestellt. Als Material für diese Analysen dienten Gewebeschnitte von operativ entfernten Mammakarzinomen (n=42), angefertigt am Institut für Pathologie (UKE, Hamburg) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Löning. Desweiteren wurden verschiedene AccuMax™ *Tissue Micro Arrays* (TMAs) der Firma ISU ABXIS Co., Ltd (Tab. 3.3) verwendet.

Tab. 3.3: Zusammenfassung der verwendeten TMAs

TMA	Bezeichnung	Anzahl der Fälle	Spots pro Fall	Spots Gesamt
Normalgewebe	A103 (VI)	45	2	90
verschiedene Tumoren + korrespondierende Normalgewebe	A301 (V)	30 30	2 1	90

Die Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden zunächst deparaffiniert und anschließend im Dampfdruckinkubator (BioGenex, San Ramon, USA) für 5 min bei 125°C in Zitrat-Puffer (BioGenex) inkubiert und danach dreimal für 3 min mit TBS, 0.05% Tween-20 gewaschen. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde durch eine Behandlung mit jeweils 100 µl DAKO REAL™ (DAKO, Glostrup) nach Angaben des Herstellers blockiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 3 min mit TBS-Tween gewaschen. Die Inkubation mit dem 1:500-verdünnten primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Im Anschluss daran wurden die Schnitte dreimal 3 min mit TBS-T gewaschen. Es folgten eine Inkubation mit jeweils 150 µl DAKO REAL™ Envision™/HRP (DAKO) für 15 min bei RT und erneut drei Waschschriffe. Zum Ablauf der Detektionsreaktion wurden die Schnitte für 10 min mit DAB (3,3'-Diaminobenzidine) inkubiert. Zur Gegenfärbung wurde für 2 sec eine Behandlung mit Mayers-Hemalaun-Lösung (Merck) vorgenommen. Danach wurden die Präparate für 2 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen und eingedeckelt.

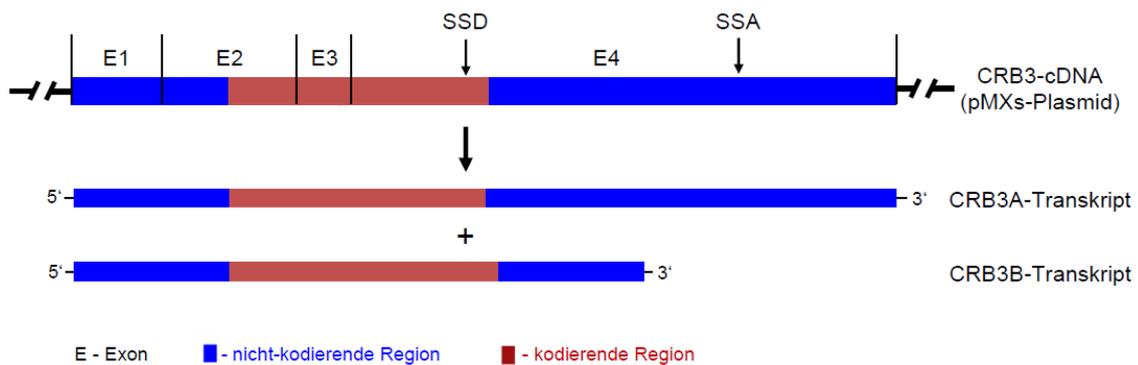
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Transformierende Eigenschaften von CRB3

Die Grundlage für die hier vorliegende Arbeit wurde durch die Entwicklung einer neuen Methode zur Identifizierung Brustkrebs-assoziiertes Gene innerhalb der Arbeitsgruppe von Dr. Volker Assmann geschaffen. Aus dem Transkriptom der humanen Mammakarzinom-Zelllinie GI-101 wurde eine retrovirale cDNA-Expressionsbibliothek generiert und NIH3T3-Zielzellen damit transduziert. Durch ein aufwendiges Selektionsverfahren wurden anschließend die cDNAs identifiziert, deren stabile genomische Integration zur Transformation der NIH3T3-Zellen führte. Im Zuge dieser Analysen wurde unter anderem CRB3 als potenzielles Proto-Onkogen identifiziert. Ein Ziel dieses Promotionsvorhabens war es deshalb, die möglichen onkogenen Eigenschaften des CRB3-Gens genauer zu charakterisieren und die molekularen Signalwege der CRB3-vermittelten malignen Entartung von Zellen aufzuklären. Des Weiteren sollte die Bedeutung der CRB3-vermittelten Transformation von Zellen für das humane Mammakarzinom untersucht werden.

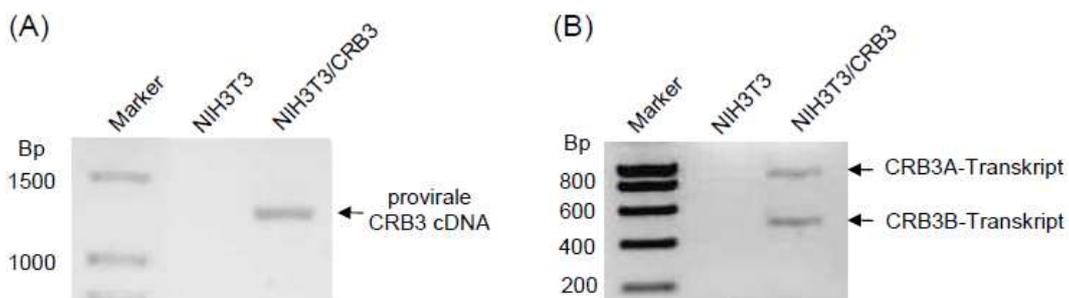
#### 4.1.1 Identifizierung von zwei CRB3-Transkriptvarianten

Für erste Untersuchungen standen murine, embryonale NIH3T3-Fibroblasten, die mit einem für das CRB3-Protein kodierenden retroviralen Expressionsplasmid (pMXs-CRB3) transduziert wurden, zur Verfügung. Bioinformatische Analysen deuteten darauf hin, dass sich von der als Provirus in das Wirtsgenom integrierten CRB3A-cDNA möglicherweise unterschiedliche Gentranskripte ableiten könnten. Wie bereits beschrieben (siehe 2.3.2), entstehen durch alternatives Spleißen des vom CRB3-Gen abgeleiteten Primärtranskripts zwei mRNA-Transkriptvarianten, die jeweils für unterschiedliche Isoformen des CRB3-Proteins kodieren. Dass die alternativen CRB3-Transkriptvarianten auch von der proviral integrierten CRB3-cDNA abgeleitet werden können, ist in Abb. 4.2 dargestellt. Sowohl die Donor- als auch die Akzeptorsequenz der alternativen Spleißstelle sind in Exon 4 der CRB3-cDNA enthalten, was die Expression beider Transkriptvarianten zur Folge haben könnte. Um diese Möglichkeit genauer zu untersuchen, wurde aus den NIH3T3/CRB3-Zellen genomische DNA und Gesamt-RNA isoliert und einer PCR-Analyse unterworfen.



**Abb. 4.2:** Schema zur Expression der zwei CRB3-Transkriptvarianten in NIH3T3/CRB3. Durch alternatives Spleißen der genomisch integrierten CRB3-cDNA (pMXs-Plasmid) entstehen beide CRB3-Transkriptvarianten. Donor- (SSD) und Akzeptorsequenzen (SSA) der alternativen Spleißstelle in Exon 4 (E4) sind durch Pfeile markiert.

Die Amplifikation der proviralen CRB3-cDNA erfolgte mit vektorspezifischen Primern, die die CRB3-cDNA flankierten. CRB3-Gentranskripte wurden mittels RT-PCR-Analyse mit den CRB3-spezifischen Primern MP25-4/MP25-12 (siehe Tab. 7.3, Anhang) dargestellt. Als Kontrollen für die PCR-Analysen wurden jeweils Ansätze mit genomischer DNA bzw. cDNA der parentalen, d.h. nicht transduzierten NIH3T3-Fibroblasten mitgeführt.



**Abb. 4.1:** PCR-Analysen mit parentalen und stabil transfizierten NIH3T3/CRB3A-Zellen. (A) Eine PCR-Analyse mit genomischer DNA ergab ein Fragment, welches der proviral integrierten CRB3-cDNA entspricht. (B) Die PCR mit cDNA und CRB3-spezifischen Primern ergab zwei PCR-Fragmente, bei denen es sich um alternativ gespleißte Varianten des CRB3-Primärtranskripts handelt.

Von genomischer DNA der stabil transfizierten NIH3T3/CRB3-Zellen wurde ein ca. 1400 Bp-Fragment amplifiziert (Abb. 4.1, A). Eine nachfolgende Sequenzanalyse bestätigte, dass es sich hierbei um die stabil in das Wirtsgenom integrierte CRB3-cDNA handelte. Bei der RT-PCR Amplifikation von CRB3-Gentranskripten wurden überraschenderweise zwei PCR-Produkte mit Fragmentgrößen von ca. 500 Bp

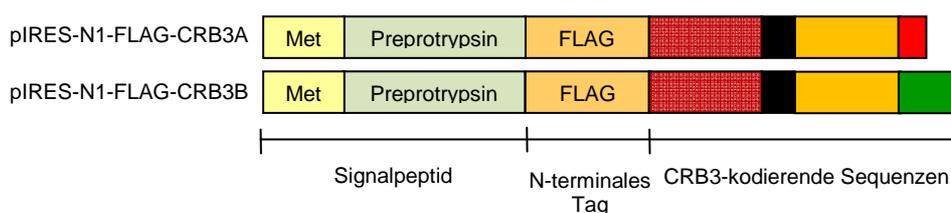
und 850 Bp gebildet (Abb. 4.1, B). Die DNA-Sequenzierung dieser PCR-Produkte ergab, dass die Amplifikationsprodukte zwei unterschiedliche CRB3-Gentranskripte darstellten, die ihrerseits für zwei unterschiedliche Isoformen des CRB3-Proteins kodieren. Das 800 Bp-Fragment entspricht dabei der Transkriptvariante (*Genebank accession number*: NM\_139161.3), welche für die CRB3A-Isoform kodiert. Das kürzere 500 Bp-Fragment entspricht der Transkriptvariante (*Genebank accession number*: NM\_174881.2), die für die CRB3B-Isoform kodiert (siehe 2.3.2; Abb. 2.5) Auf die Verwendung der offiziellen Bezeichnung als Transkriptvariante II (CRB3A) bzw. III (CRB3B) wurde in dieser Arbeit aus Übersichtsgründen verzichtet.

Die Erkenntnis, dass die NIH3T3/CRB3-Zelllinie beide Spleißvarianten des CRB3-Transkripts und demzufolge beide CRB3-Isoformen exprimiert, warf die Frage auf, welches der beiden Genprodukte die beobachteten transformierenden Eigenschaften vermittelt.

#### **4.1.2 Herstellung von CRB3A- und CRB3B-Expressionsplasmiden**

Um eindeutig zu klären, welche der beiden CRB3-Isoformen die onkogene Transformation der Zellen vermittelt, wurden Expressionsplasmide generiert, die ausschließlich für CRB3A oder CRB3B, nicht aber für CRB3A und CRB3B kodierten. Da zu Beginn dieser Studien keine CRB3-spezifischen Antikörper zur Verfügung standen, sollten Expressionsplasmide generiert werden, die für Epitop-getaggte CRB3-Proteine kodierten. Weil im C-terminalen Bereich wichtige Binde-domänen lokalisiert sind, deren Funktion durch das Anhängen eines FLAG-Tags beeinträchtigt sein könnte, kam ausschließlich eine N-terminale Markierung der Proteine in Frage. Hierbei musste wiederum beachtet werden, dass die ersten 20 Aminosäuren der CRB3-Proteine als Signalpeptid fungieren, dessen Abspaltung zum Verlust eines N-terminalen FLAG-Tags führen würde. Um das zu vermeiden, wurden CRB3-cDNAs in die Plasmide eingebracht, denen die für das Signalpeptid kodierende DNA-Sequenz fehlte. Ersetzt wurde das CRB3-Signalpeptid durch eine dem FLAG-Tag vorgeschaltete Preprotrypsin-Sequenz. Die CRB3A- und CRB3B-cDNAs wurden unter Verwendung der Primerpaare CRB3-1/CRB3-Ila-6 bzw. CRB3-1/CRB3-2 (siehe Tab. 7.3, Anhang) amplifiziert und in den pFLAG-CMV-3-Vektor (Sigma) kloniert. Die Funktionalität der Konstrukte wurde in

transienten Transfektionen mit  $\psi$ nx-eco-Zellen und anschließenden Western Blot Analysen sichergestellt. Im Anschluss daran, wurden die FLAG-CRB3A- und FLAG-CRB3B-kodierenden Sequenzen unter Verwendung der Oligonukleotid-Paare FLAG-CRB3-XhoI/Crb3-IIa-9-XhoI und FLAG-CRB3-XhoI/Crb3-IIIb-10-XhoI aus den pFLAG-CMV-3-Konstrukten amplifiziert und in den bicistronischen pIRES-N1-Vektor einkloniert. Der Aufbau der pIRES-N1-Konstrukte ist in Abb. 4.2 schematisch dargestellt.

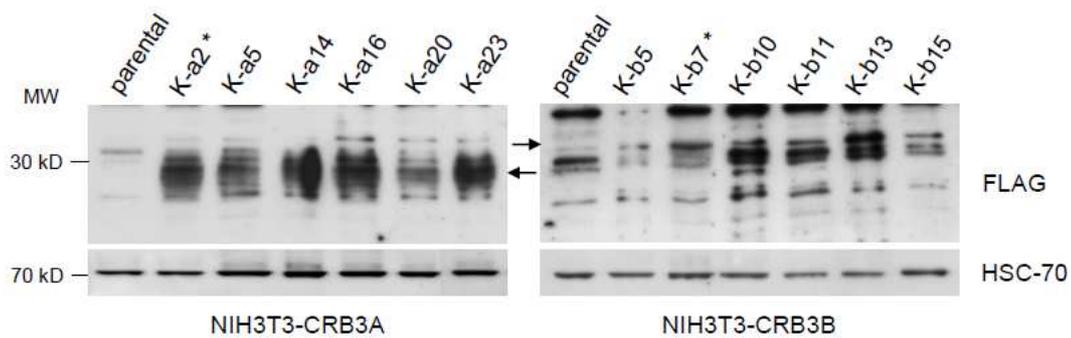


**Abb. 4.3: Schematischer Aufbau der FLAG-CRB3A und FLAG-CRB3B-exprimierenden pIRES-N1-Konstrukte.** Eine Preprotrypsin-Sequenz vor dem FLAG-Tag fungiert als Signalpeptid. Die für unterschiedliche Proteindomänen kodierenden CRB3-Sequenzen sind folgendermaßen dargestellt: braun - extrazelluläre Domäne; schwarz - Transmembran-Domäne; gelb - zytoplasmatische Domäne; rot/grün - isoformspezifische C-Termini.

#### 4.1.3 Stabile Transfektion von NIH3T3-Zellen mit isoformspezifischen FLAG-CRB3-Expressionsplasmiden

Um zu klären, welche der beiden CRB3-Isoformen transformierende Eigenschaften besitzt, wurden NIH3T3-Fibroblasten stabil mit den FLAG-CRB3A bzw. FLAG-CRB3B-kodierenden pIRES-N1-Konstrukten transfiziert und Zellklone durch Zugabe von Geneticin in das Kulturmedium selektioniert. Anhand von Western Blot Analysen wurden mittels FLAG-M2-Antikörper (Sigma) Zellklone mit einer starken CRB3A- bzw. CRB3B-Proteinexpression identifiziert.

Abbildung 4.4 zeigt exemplarisch die Western Blot Analyse von jeweils 6 CRB3A- und CRB3B-exprimierenden Zellklonen. Bemerkenswert ist, dass alle CRB3A-exprimierenden Zellklone eine starke Überexpression des Proteins aufweisen, während die im Western Blot detektierten Signale für das CRB3B-Protein in allen Zellklonen fragwürdig und schwer zu deuten waren. Die Expression des CRB3B-Transgens konnte zwar auf transkriptioneller, nicht aber auf Proteinebene belegt werden. Diese Befunde gaben Anlass zur Durchführung weiterer Untersuchungen zur Stabilität des CRB3B-Proteins (siehe 4.6).



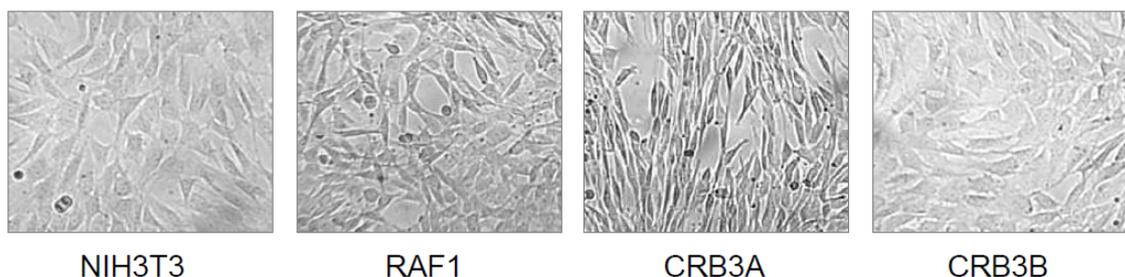
**Abb. 4.4:** Western Blot Analyse von NIH3T3-Zellklonen mit stabiler FLAG-CRB3A- (links) oder FLAG-CRB3B-Expression (rechts). Die Detektion der Proteine bei ~25kD (CRB3A) und ~30kD (CRB3B) erfolgte mittels FLAG-M2-Antikörper. Als Ladekontrolle diente HSC-70. Die mit Sternchen markierten Zellklone K-a2 und K-b7 wurden zur Durchführung der Transformations-Assay verwendet.

Zur Durchführung der Transformations-Assays ausgewählte NIH3T3/CRB3A und NIH3T3/CRB3B-Zelllinien (K-a2 bzw. K-b7, siehe Abb. 4.4) sollten anschließend hinsichtlich ihrer Zellmorphologie, der Zellteilungsaktivität, des Potenzials zum Substrat-unabhängigen Wachstum und der Fähigkeit zur Tumorbildung *in vivo* untersucht werden. Bei allen durchgeführten Assays wurden parentale NIH3T3-Zellen als Negativkontrolle und NIH3T3/RAF1-Zellen, welche das gut charakterisierte Onkogen RAF1 stabil überexprimieren als Positivkontrolle mitgeführt.

#### 4.1.4 CRB3A induziert die morphologische Transformation von NIH3T3 Zellen

Veränderungen der Zellmorphologie sind ein wichtiges Indiz für die Transformation von NIH3T3-Fibroblasten. Um die Morphologie von parentalen, CRB3A-, CRB3B-, sowie RAF1-überexprimierenden NIH3T3-Zellen vergleichend auszuwerten, wurden die Zelllinien bei annähernd gleicher Konfluenz (~70%) lichtmikroskopisch begutachtet und bei 40-facher Vergrößerung fotografisch dokumentiert.

Parentale NIH3T3-Zellen besitzen flache Zellkörper, relativ kurze Zellfortsätze und weisen ein regelmäßiges Wachstum auf. Wie in Abb. 4.5 zu sehen ist, weichen RAF1- und CRB3A-überexprimierenden Zellen in ihrer Morphologie sehr stark von der parentalen Zelllinie ab.



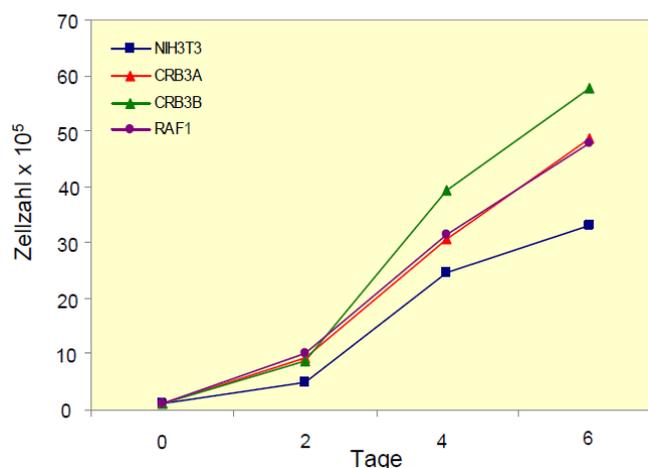
**Abb. 4.5: Die Morphologie von parentalen, RAF1-, CRB3A-, und CRB3B-überexprimierenden NIH3T3-Zellen im Vergleich. Die Auswertung erfolgte bei 40-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop.**

Die Zellkörper der RAF1-exprimierenden Fibroblasten sind kleiner, stark lichtbrechend und wachsen im Vergleich zu parentalen Zellen deutlich ungeordneter. CRB3A-exprimierende Zellen sind auffallend spindelförmig, ebenfalls stark lichtbrechend und bilden lange Zellfortsätze aus. Bei zunehmender Konfluenz fällt die „verwirbelte“ Anordnung der Zellen auf. CRB3B-überexprimierenden Fibroblasten weisen keine erkennbaren morphologischen Veränderungen auf. Sie unterscheiden sich in Form und Anordnung nicht von den parentalen NIH3T3-Zellen (siehe Abb. 4.5)

#### **4.1.5 CRB3A und CRB3B vermitteln eine Steigerung der Teilungsaktivität in NIH3T3-Fibroblasten**

Ein weiteres Kriterium zur Verifizierung der transformierenden Eigenschaften eines Gens, ist dessen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Zellen. Um mögliche CRB3A- bzw. CRB3B-vermittelte Effekte festzustellen, wurde die Teilungsaktivität von parentalen, RAF1-, CRB3A- und CRB3B-überexprimierenden NIH3T3-Zellen über einen Zeitraum von 6 Tagen analysiert und verglichen.

Die in Abb. 4.6 dargestellten Proliferationskurven zeigen, dass die Expression von CRB3A im gleichen Maß zu einer erhöhten Teilungsaktivität von NIH3T3-Zellen führt wie die Expression des Onkogens RAF1. Interessanterweise wird ein noch stärkerer proliferationsfördernder Effekt durch die CRB3B-Expression erzielt.



**Abb. 4.6:** Die Analyse des Proliferationsverhaltens von parentalen, RAF1-, CRB3A und CRB3B-exprimierenden NIH3T3-Zellen über einen Zeitraum von 6 Tagen. Die Expression von CRB3A und CRB3B führt zur Steigerung der Teilungsaktivität in NIH3T3 Zellen.

Die aus dem Verlauf der Proliferationskurven berechneten Verdopplungszeiten ( $T_D$ ) spiegeln einen Anstieg in der Teilungsaktivität durch die Expression von CRB3A und CRB3B in NIH3T3-Fibroblasten ebenfalls wieder (siehe Tab.4.1).

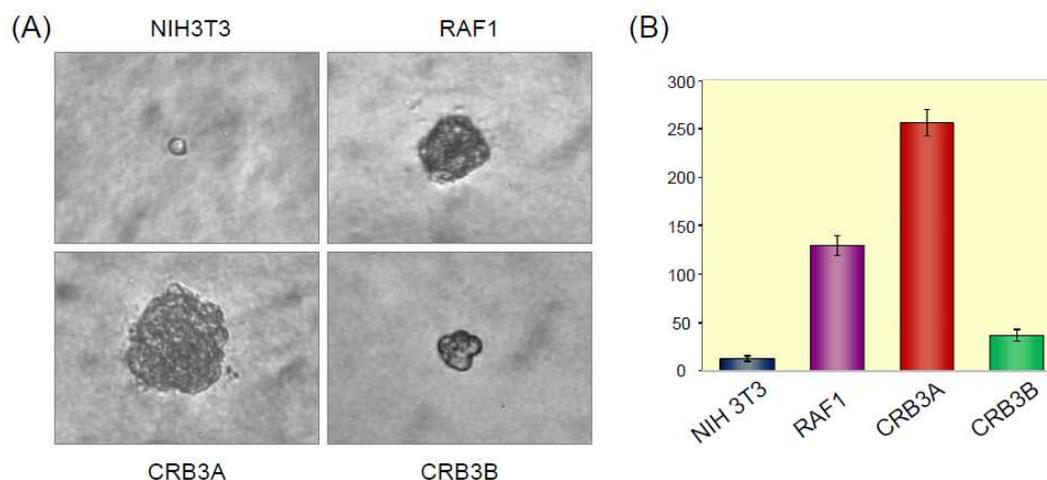
**Tab. 4.1:** Verdopplungszeiten ( $T_D$ ) der analysierten Zelllinien

Zelllinie	NIH3T3	RAF1	CRB3A	CRB3B
$T_D$ [h]	20,8	19,3	19,4	18,1

#### 4.1.6 CRB3A exprimierende NIH3T3-Zellen wachsen Substrat-unabhängig

Transformierte Zellen besitzen das Potenzial verankerungsunabhängig, d.h. ohne Anheftung an ein festes Substrat, zu proliferieren. Um zu untersuchen, ob CRB3A- bzw. CRB3B-exprimierende Zellen entsprechende Fähigkeiten *in vitro* entwickeln, wurden Soft-Agar Assays durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden in Agar-haltiges Medium eingebettet und ohne Anheften an ein festes Substrat kultiviert.

Parentale NIH3T3-Fibroblasten waren unter den im Soft-Agar Assay gegebenen Kulturbedingungen nicht teilungsfähig. Sie bildeten keine Zellkolonien aus, nur vereinzelt wurden Zellcluster im 2-4-Zellstadien beobachtet.



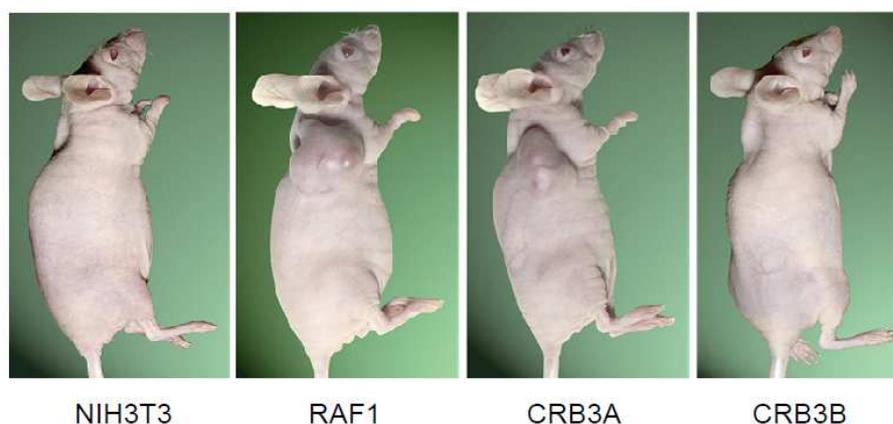
**Abb. 4.7: Substrat-unabhängiges Wachstum von parentalen, RAF1-, CRB3A- und CRB3B-exprimierenden NIH3T3-Zellen im Soft-Agar-Assay. Gezeigt sind repräsentative Zellkolonien der untersuchten Zelllinien, aufgenommen bei 40-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop (A) und die Quantifizierung der gebildeten Kolonien im Diagramm (B).**

Für RAF1- und CRB3A-exprimierende Fibroblasten konnte das Wachstum von Zellkolonien im Soft-Agar festgestellt werden. Bemerkenswert ist dabei der Unterschied in Größe und Anzahl der ausgebildeten Kolonien. CRB3A induzierte im Vergleich zum Onkogen RAF1 das Wachstum von deutlich größeren (Abb. 4.7, A) und annähernd doppelt sovielen Kolonien (Abb. 4.7, B). Im Gegensatz hierzu bildeten CRB3B-exprimierende Zellen nur sehr wenige und kleine Kolonien aus, die sich aus maximal 4-8 Zellen zusammensetzten. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass NIH3T3-Zellen durch die CRB3A-Expression, nicht aber durch die CRB3B-Expression, die Fähigkeit zum Substrat-unabhängigen Wachstum entwickeln.

#### 4.1.7 NIH3T3/CRB3A-Zellen bilden Tumoren in immundefizienten Mäusen

Die *in vivo* Tumorigenität von CRB3A- und CRB3B-exprimierenden NIH3T3-Fibroblasten wurde durch Implantation der Zellen in immundefiziente Nacktmäuse (Stamm: NMRI) ermittelt. Parallel dazu wurden die parentalen und RAF1-exprimierenden Zelllinien als Kontrollen mitgeführt. Die Injektion von jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen erfolgte subkutan zwischen die Schulterblätter der Tiere, wobei pro Zelllinie fünf Tiere injiziert wurden. Die Tiere wurden anschließend alle drei Tage begutachtet und hinsichtlich der Bildung von Tumoren untersucht. Die Terminierung der

Tiere wurde bei einer Tumorgroße von 1 cm<sup>3</sup> vorgenommen. Alle verbliebenen tumorfreien Versuchstiere wurden nach insgesamt 70 Tagen terminiert.



**Abb. 4.8:** Die Untersuchung der *in vivo* Tumorigenität von parentalen, RAF1-, CRB3A und CRB3B-exprimierenden NIH3T3-Fibroblasten. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Tier aus jeder Versuchsgruppe. RAF1 und CRB3A induzierten ein starkes Tumorwachstum. Parentale und CRB3B-exprimierende Zellen bildeten nach 70 Tagen keine Tumoren aus.

Jeweils ein repräsentatives Tier pro Versuchsgruppe ist in Abb. 4.8 dargestellt. Eine starke Tumorigenität konnte für CRB3A-exprimierende NIH3T3-Zellen festgestellt werden. Erwartungsgemäß induzierte auch RAF1 Tumorwachstum in allen fünf Versuchstieren. Tab. 4.2 ist zu entnehmen, dass die mittlere Latenz der CRB3A-induzierten Tumore mit 11,5 Tagen im Vergleich zur RAF1-Positivkontrolle mit 15 Tagen sogar verkürzt war. Für parentale NIH3T3 und NIH3T3/CRB3B-Zellen konnte kein Tumorwachstum festgestellt werden.

**Tab. 4.2:** Anzahl und Latenz der Tumorbildung verschiedener NIH3T3-Zelllinien

Zelllinie	NIH3T3	RAF1	CRB3A	CRB3B
Tumoren pro Injektion (tastbar)	0/5	5/5	5/5	0/5
Latenz (Tage)	--	13-19	10-13	--
Median (Tage)	--	15	11,5	--

Anhand der durchgeführten Transformations-Assays konnte erstmals gezeigt werden, dass ein CRB3-Genprodukt onkogene Eigenschaften besitzt. Die stabile Expression von CRB3A in NIH3T3-Zellen führte zu Veränderungen der Morphologie, steigerte die Zellteilungsaktivität, vermittelte die Fähigkeit zum

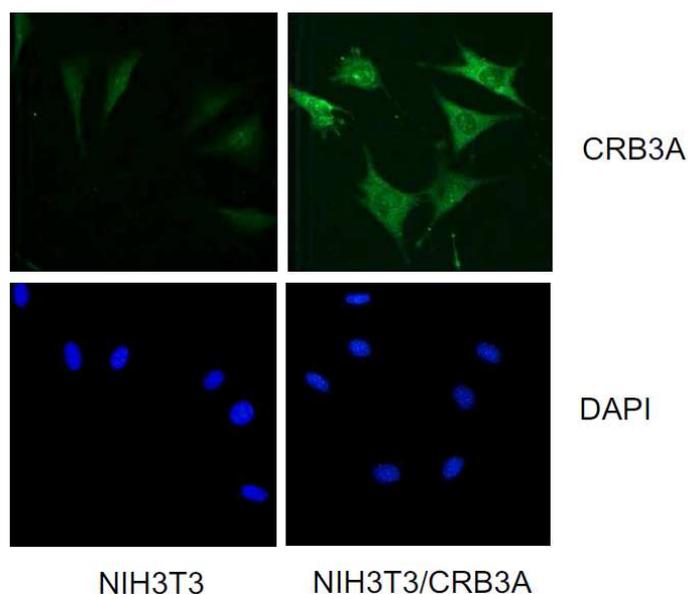
Verankerungs-unabhängigen Wachstum *in vitro* und die Bildung von Tumoren *in vivo*. Abgesehen von einem aktivierenden Einfluss auf das Proliferationsverhalten der NIH3T3-Zellen wurden für CRB3B keine transformierenden Fähigkeiten nachgewiesen. Zusammenfassend kann das CRB3-Gen eindeutig als neues Proto-Onkogen klassifiziert werden.

## **4.2 Die Signalkaskade der CRB3A-induzierten Transformation**

In weiterführenden Studien galt es, die molekularen Zusammenhänge der CRB3A-induzierten Transformation in NIH3T3-Zellen aufzuklären. Die Analyse der subzellulären Lokalisation, sowie verschiedene Mutationsstudien und Bindungsassays sollten der genaueren Charakterisierung des CRB3A-Proteins und der Identifizierung direkter Interaktionspartner und weiterer „*downstream*“-Effektoren dienen.

### **4.2.1 CRB3A ist intrazellulär lokalisiert in NIH3T3-Zellen**

Sowohl immunhistochemische Studien zur Analyse der CRB3A-Expression in verschiedenen humanen Geweben (siehe 4.7 bis 4.9), als auch Arbeiten zur subzellulären Sortierung des Crumbs-Proteins in *Drosophila*-Embryonen [90], lieferten ernsthafte Hinweise darauf, dass eine geänderte subzelluläre Sortierung des CRB3A-Proteins mit der Entwicklung transformierender Eigenschaften einhergehen könnte. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde die subzelluläre Lokalisation von CRB3A durch eine immunzytochemische Fluoreszenzfärbung von kultivierten NIH3T3/CRB3A-Zellen bestimmt. Als Primärantikörper wurde ein CRB3A-spezifischer Antikörper verwendet, dessen Herstellung in Kapitel 4.4.1 erläutert wird. Der entsprechende Sekundärantikörper war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-488 konjugiert.



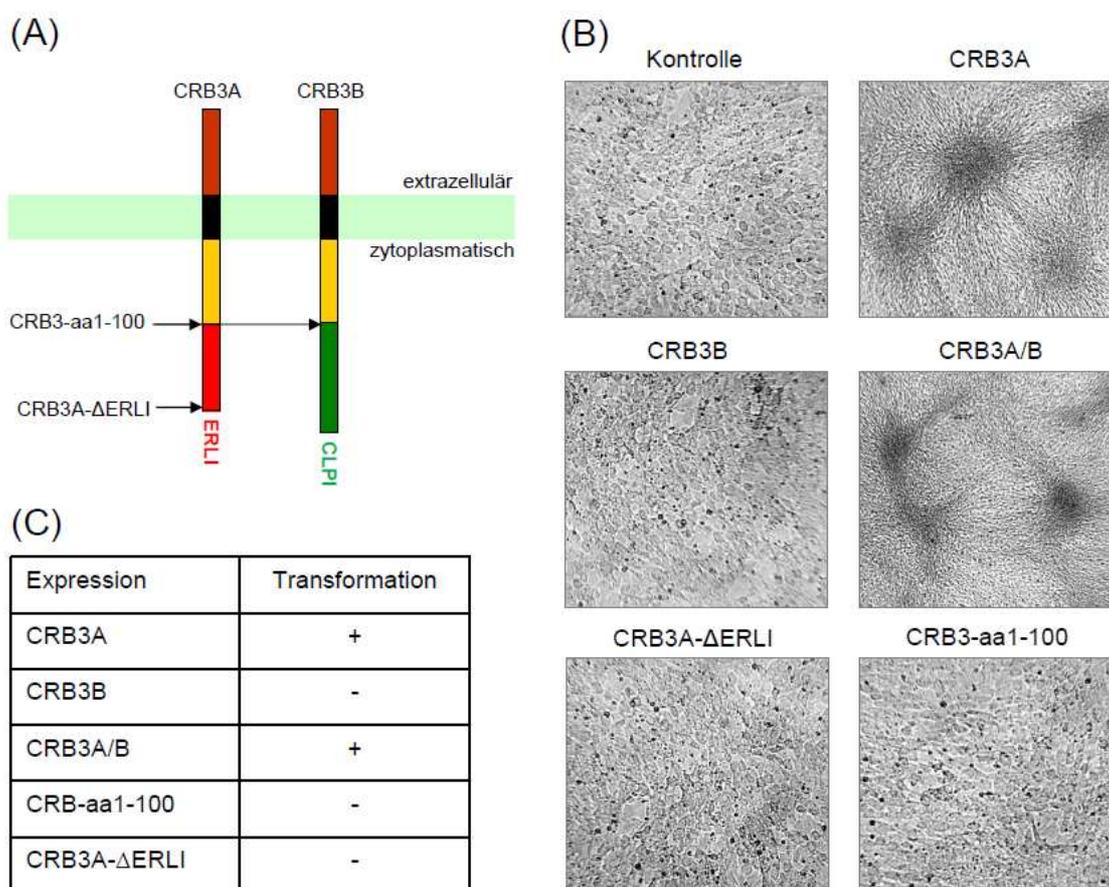
**Abb. 4.9:** Die Detektion der subzellulären Lokalisation des CRB3A-Proteins in NIH3T3-Zellen, durchgeführt mit CRB3A-spezifischen Primärantikörpern. Das CRB3A-Protein ist eindeutig im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte NIH3T3-Zellen. Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung visualisiert.

Durch die immunzytochemischen Färbungen konnte ausschließlich eine zytoplasmatische Lokalisation des CRB3A-Proteins in NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.9). Bisher beschriebene Funktionen von CRB3 in Epithelzellen sind eng mit der membranständigen Lokalisation des Proteins verbunden. Diese Ergebnisse zeigen jedoch, dass die transformierenden Eigenschaften von CRB3A mit einer zytoplasmatischen Lokalisierung assoziiert sind.

#### **4.2.2 Das C-terminale ERLI-Motiv ist essenziell für die CRB3A-induzierte Transformation von NIH3T3-Zellen**

Durch Studien mit MDCK-Zellen wurde gezeigt, dass die C-terminale ERLI-Domäne des CRB3A-Proteins essenziell ist für die Ausbildung der epithelialen Zellpolarität und die Bildung von *tight junctions*. Dem ebenfalls in der zytoplasmatischen Domäne gelegenen FERM-Bindemotiv wird eine stabilisierende Funktion bei der Interaktion mit CRB3A-Komplexpartnern zugeschrieben (siehe 2.2.1). Um zu klären, welche der CRB3-Proteindomänen für die Entwicklung des transformierenden Potenzials essenziell sind, wurden die „Wildtyp“ CRB3-Isoformen und verschiedene CRB3-Mutanten durch einen retroviralen Gentransfer in NIH3T3-Zellen eingebracht und anschließend im Fokus Assay hinsichtlich ihrer

transformierenden Eigenschaften untersucht. Hierfür wurden retrovirale pMXs-Expressionplasmide hergestellt, welche für CRB3A oder B, CRB3A und B, CRB3aa1-100 und CRB3A- $\Delta$ ERLI kodierten (Abb. 4.8, A). Die CRB3aa1-100-Mutante kodiert für ein trunkiertes CRB3-Protein, welches die für beide Isoformen identische Aminosäuresequenz (1-100) enthält. Bei CRB3A- $\Delta$ ERLI handelt es sich um eine verkürzte Variante von CRB3A. Durch Deletion der C-terminalen Aminosäuren -ERLI fehlt dieser Mutante die PDZ-Protein-Bindedomäne. Der schematische Aufbau der Konstrukte ist in Abb. 4.10 dargestellt. Als Template für die Amplifikation der entsprechenden DNA-Fragmente dienten die unter 4.1.2 beschriebenen pIRES-Konstrukte, die verwendeten Oligonukleotide sind Tab. 7.3 im Anhang zu entnehmen.

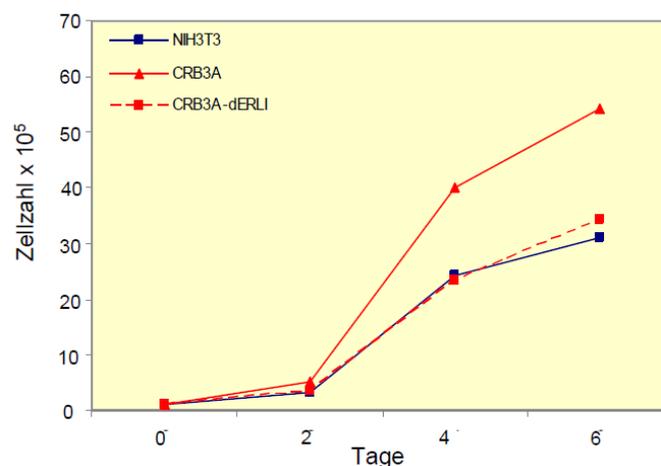


**Abb. 4.10: Analyse der transformierenden Eigenschaften von CRB3-Isoformen und Mutanten im Fokus-Assays.** Zellkulturschalen, in denen keine Fokus-Bildung zu beobachten war, sind bei 20-facher und Schalen mit ausgeprägten Foci bei 5-facher Vergrößerung abgebildet. Mit CRB3A transduzierte NIH3T3-Zellen bildeten zahlreiche Foci aus. CRB3B und die beiden Mutanten induzierten keine morphologischen Veränderungen.

Zur Durchführung des retroviralen Gentransfers wurden  $\psi$ nx-eco-Zellen mit pMXs-Expressionsvektoren transfiziert (siehe 3.2.7). Nach 48 h wurden die in den Zell-

kulturüberstand abgegebenen retroviralen Partikel geerntet und NIH3T3-Zielzellen damit transduziert. Da NIH3T3-Zellen zur spontanen Transformation neigen, wurden jeweils zwei Kulturschalen mit unbehandelten Zellen parallel mitgeführt. 14 Tage nach Transduktion wurden die Zellkulturschalen hinsichtlich morphologischer Veränderungen und Focus-Bildung begutachtet. Zur Ausbildung von Foci kam es bei Zellen, die CRB3A oder CRB3A in Kombination mit CRB3B exprimierten (Abb. 4.9, B). Die mit CRB3B, CRB3aa1-100 und CRB3A- $\Delta$ ERLI transduzierten Zellen bildeten keine Foci aus und zeigten im Vergleich mit unbehandelten NIH3T3-Zellen auch keine morphologischen Veränderungen. Aus diesen Beobachtungen kann geschlussfolgert werden, dass die C-terminale PDZ-Protein-Bindedomäne essenziell für die Vermittlung der CRB3A-induzierten Transformation von NIH3T3-Zellen ist.

Ob die ERLI-Sequenz auch für die Steigerung der Zellteilungsaktivität essenziell ist, wurde an NIH3T3-Zellen untersucht, die CRB3A und CRB3A- $\Delta$ ERLI nach retroviraler Transduktion stabil überexprimierten. Analog zu den in 4.1.5 durchgeführten Studien wurde das Teilungsverhalten der Zelllinien über einen Zeitraum von 6 Tagen analysiert und mit dem der parentalen Zellen verglichen.

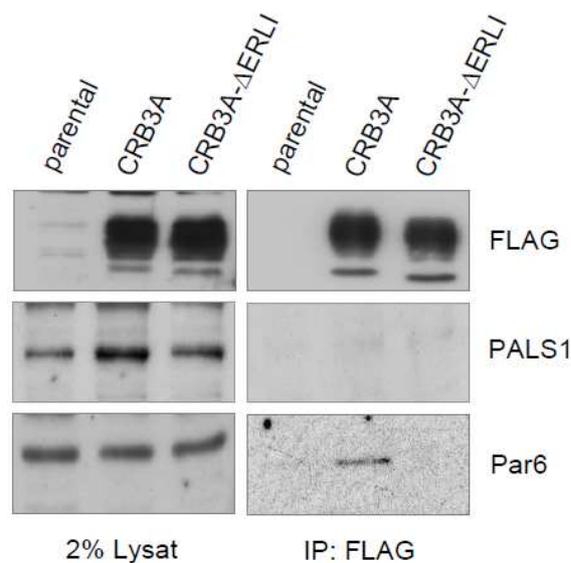


**Abb. 4.11: Analyse der Teilungsaktivität von CRB3A- und CRB3A-deltaERLI exprimierenden NIH3T3-Zellen. Die Deletion des ERLI-Motivs führt zum Verlust des proliferationsfördernden Effekts von CRB3A in NIH3T3-Fibroblasten.**

Die Deletion der ERLI-Domäne führt zum Verlust der proliferationsfördernden Funktion von CRB3A. Anhand der erstellten Proliferationskurven (Abb. 4.11) ist zu erkennen, dass die CRB3A- $\Delta$ ERLI exprimierende Zelllinie ein nahezu identisches Teilungsverhalten wie die parentale NIH3T3-Zelllinie aufweist.

#### 4.2.3 Identifizierung von CRB3A-Bindungspartnern in NIH3T3-Zellen

In Studien mit Zellen epithelialen Ursprungs konnten die PDZ-Proteine PALS1 und Par6 als direkte Interaktionspartner von CRB3A identifiziert werden [69-71]. Das ERLI-Motiv in CRB3A ist dabei essenziell für die Bindung der beiden Proteine. Ob es auch in NIH3T3-Fibroblasten zu derartigen Wechselwirkungen kommt, sollte durch Bindungsstudien mit CRB3A und der ERLI-Deletionsmutante geklärt werden. Zur Durchführung von Co-Immunpräzipitationen („Co-IP“) wurden Lysate aus NIH3T3-Zellen, die N-terminal FLAG-markiertes CRB3A bzw. CRB3A- $\Delta$ ERLI stabil überexprimierten, verwendet. Als Kontrolle dienten parentale NIH3T3-Zellen. Die Immunpräzipitation der FLAG-Fusionsproteine und daran gebundener Proteine erfolgte mit Hilfe des ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2 Affinitätsgels von Sigma. Der Nachweis der (co-)präzipitieren Proteine erfolgte durch Western Blot Analysen.



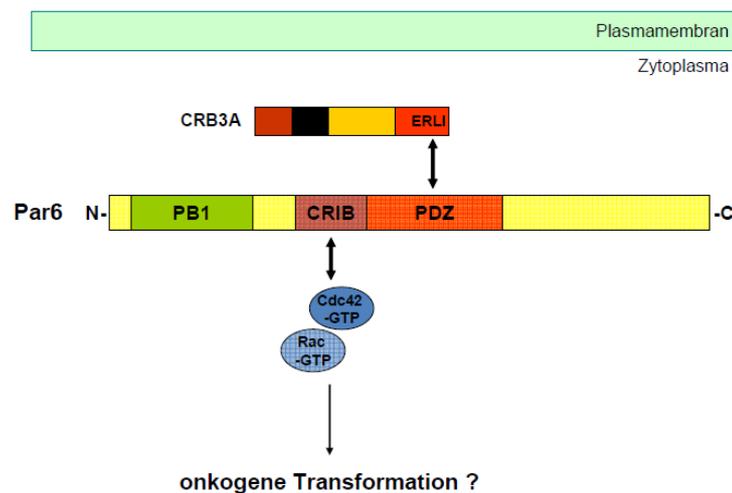
**Abb. 4.12: Identifizierung eines CRB3A-Interaktionspartners in NIH3T3-Zellen durch Co-Immunpräzipitation (Co-IP) mit FLAG-CRB3A und FLAG-CRB3- $\Delta$ ERLI.** Für die Durchführung der Co-IP wurden Sepharose-gekoppelte FLAG-Antikörper verwendet. Das PDZ-Protein Par6 konnte mit FLAG-CRB3A, aber nicht mit FLAG-CRB3- $\Delta$ ERLI co-präzipitiert und im Western Blot nachgewiesen werden. Parentale NIH3T3-Zellen dienten als Kontrollen.

Wie die Western Blot Analysen (Abb. 4.12) belegen, wurden gleiche Mengen FLAG-CRB3A- und FLAG-CRB3-ERLI-Protein für die Co-Immunpräzipitationen eingesetzt. Der Immunoblot mit Par6-spezifischen Antikörpern (Abcam) ergab ein Signal für die Co-IP mit FLAG-CRB3A, aber nicht für die Co-IP mit der ERLI-Mutante. Durch die mitgeführten Lysat-Kontrollen konnte ausgeschlossen werden, dass dieses Signal als Folge einer gesteigerten Par6-Expression in den CRB3A-

exprimierenden Zellen zustande kam. Der Nachweis von PALS1 blieb für alle Co-IP-Ansätze ohne Befund.

#### 4.2.4 Der CRB3A-Par6-Komplex rekrutiert die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1/2/3

Basierend auf dem Nachweis der CRB3A-Par6-Interaktion in NIH3T3-Zellen wurde eine Arbeitshypothese zur Entschlüsselung der weiteren Signalkaskade aufgestellt. In Studien zum transformierenden Potenzial der neuronalen Proteine Rin und Rit wurde gezeigt, dass deren Bindung an die PDZ-Domäne von Par6 zur GTP-abhängigen Rekrutierung der kleinen RhoGTPasen Cdc42 und Rac1/2/3 an die CRIB-Domäne des Par6-Proteins führt (Abb. 4.13) [91]. Die Aktivierung von Cdc42 und Rac1/2/3 trägt wiederum zur onkogenen Transformation in NIH3T3-Fibroblasten bei.



**Abb. 4.13:** Arbeitshypothese zur CRB3A-Signalkaskade. Die intrazelluläre Expression von CRB3A und die nachgewiesene Wechselwirkung mit Par6 könnte zur Rekrutierung von aktiviertem Cdc42/Rac führen, die ihrerseits als Effektoren zahlreicher zellulärer Prozesse zur onkogenen Transformation der NIH3T3-Zellen beitragen könnten.

Des Weiteren belegen Studien an MDCKII-Zellen, dass die Interaktion zwischen Par6 und Cdc42 die Ausbildung der *tight junctions* und somit die Differenzierung der epithelialen Zellen negativ reguliert [92]. Eine ähnliche Signalkaskade könnte auch für die CRB3A-induzierte Transformation verantwortlich sein. Um zu überprüfen, ob es in Folge der Komplexbildung zwischen CRB3A und Par6 tatsächlich zur Rekrutierung der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1/2/3 kommt, wurden GTPase-

Aktivierungsassays mit parentalen, CRB3A- und CRB3A- $\Delta$ ERLI-exprimierenden NIH3T3-Zelllinien durchgeführt. Das Prinzip des angewendeten Assays beruht auf dem für Rho-GTPasen charakteristischen zyklischen Wechsel zwischen unterschiedlichen Aktivierungszuständen und der damit assoziierten Bindungsaffinität gegenüber spezifischen Effektorproteinen (vereinfacht dargestellt in Abb. 4.15).

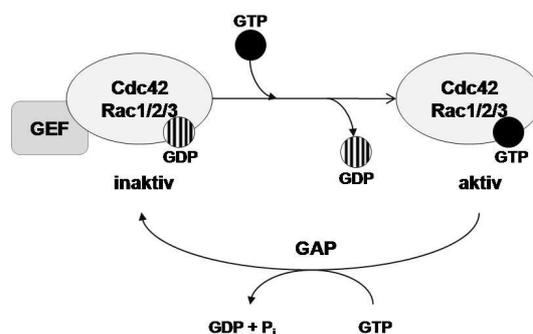
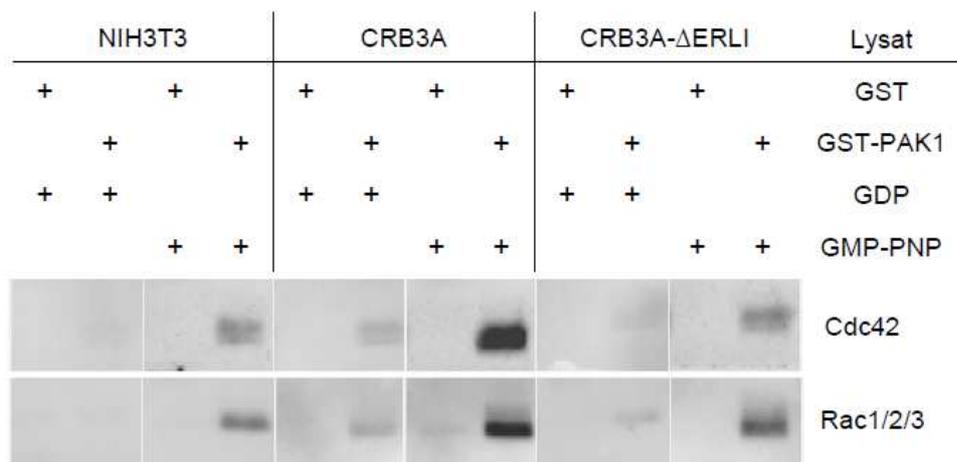


Abb. 4.14: Die kleinen Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1/2/3 wechseln zyklisch zwischen verschiedenen Aktivierungszuständen. Spezifische Guanosin-Austausch-Faktoren (GEFs, *guanosine exchange factors*) katalysieren die Auswechslung von gebundenem GDP durch GTP, was zu einer Aktivierung der GTPasen führt. Eine intrinsische Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP, die durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) verstärkt wird, hat wiederum die Inaktivierung der GTPasen zur Folge.

Die als GST-Fusionsprotein exprimierte CRIB-Domäne des PAK1-Proteins wurde im „Pulldown-Assay“ als Bindungspartner für Cdc42 und Rac1/2/3 eingesetzt. Das CRIB-Motiv bindet spezifisch die GTP-gebundene Form der Rho-GTPasen und inhibiert intrinsisch die Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP. Im Pulldown mit GST-PAK1-CRIB und GDP wird die „Grundaktivität“ der RhoGTPasen erfasst, d.h. es werden Cdc42- und Rac1/2/3-Moleküle detektiert, die zum Zeitpunkt der Präzipitation im GTP-gebundenen Zustand vorliegen. Die Akkumulation von aktivierten Cdc42- bzw. Rac1/2/3-Molekülen sollte durch Zugabe des nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogons GMP-PNP erzielt werden. Als Kontrollansätze wurden entsprechende Kombinationen mit GST-Protein mitgeführt (Abb. 4.14). Die aus den untersuchten Zelllinien präzipitierten Cdc42- und Rac1/2/3-Mengen wurden durch Western Blot Analysen detektiert.



**Abb. 4.15: GTPase Aktivierungs-Assay zum Nachweis von GTP-gebundenem Cdc42 und Rac1/2/3 in parentalen, CRB3A- und CRB3A- $\Delta$ ERLI-exprimierenden NIH3T3-Zellen.** Tabellarisch dargestellt ist die jeweilige Zusammensetzung des Pulldown-Ansatzes. GST-Proteine dienen als Kontrollen. Für die Western Blot Analysen wurden Cdc42- und Rac1/2/3-spezifische Antikörper verwendet. Die CRB3A-Expression führt zu einer gesteigerten Cdc42- und Rac1/2/3-Grundaktivität (GST-PAK1/GDP) und zu einer gesteigerten Akkumulation der aktivierten GTPasen nach Zugabe des nicht-hydrolysierbarem GTP-Derivats (GST-PAK1/GMP-PNP).

Verglichen mit parentalen und NIH3T3/CRB3A- $\Delta$ ERLI-Zellen wurde für NIH3T3/CRB3A-Zellen eine erhöhte Cdc42- und Rac1/2/3-Grundaktivität (Abb. 4.15, GST-PAK1+GDP) nachgewiesen. Eine Verstärkung dieses Signals wurde durch Zugabe von GMP-PNP erzielt. In CRB3A-exprimierenden Zellen kommt es zu einer deutlich gesteigerten Akkumulation von aktivierten Cdc42- und Rac1/2/3-Molekülen. Für NIH3T3/CRB3A-ERLI-Zellen detektierte Signale fallen im Vergleich zur parentalen Kontrolle nur geringfügig stärker aus. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Expression von CRB3A zur Aktivierung der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1/2/3 in NIH3T3-Zellen führt. Die CRB3A- $\Delta$ ERLI-Mutante ist nicht in der Lage diesen Effekt zu vermitteln. Dies lässt die Vermutung zu, dass es zur Bildung eines ternären Komplexes bestehend aus CRB3A, Par6 und aktivierten Cdc42- und Rac1/2/3-Molekülen kommt.

### 4.3 CRB3A führt zu Veränderungen im Genexpressionsmuster von NIH3T3-Zellen

Um festzustellen, ob die CRB3A-Expression Unterschiede im Genexpressionsprofil von NIH3T3-Zellen hervorruft, wurde eine vergleichende Mikroarray Analyse

mit NIH3T3- und NIH3T3/CRB3A-Zelllinien (siehe 4.1.3) durchgeführt. Unter Verwendung von *Agilent Whole Mouse Genome 4x44 K* Mikroarrays wurden die Expressionsprofile der beiden Zelllinien im Triplikot bestimmt.

Im Zuge der bioinformatischen Auswertung der Mikro Array-Analyse (siehe 3.3.20) konnten 2020 Transkripte in den beiden Zelllinien als signifikant differenziell reguliert identifiziert werden. Von diesen Genen sind in der NIH3T3/CRB3A-Zelllinie im Vergleich zur parentalen Zelllinie 1009 hoch- und 1011 herabreguliert.

**Tab. 4.4: Auswahl der durch die CRB3A-Expression deregulierten Gene**

Gen-Name	Gen-Symbol	Genebank-Nr.	FC*
<b>Hochregulierte Gene**</b>			
Matrix metallopeptidase 3	Mmp3	NM_010809	+271,19
Dickkopf homolog 2 ( <i>Xenopus laevis</i> )	Dkk2	NM_020265	+236,85
Interleukin 33	9230117N10Rik	NM_133775	+202,42
1110018M03Rik	1110018M03Rik	NM_026271	+135,31
Cholecystokinin	Cck	NM_031161	+126,34
Matrix metallopeptidase 10	Mmp10	NM_019471	+112,21
Killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 15	Klra15	NM_013793	+81,68
Killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 22	Klra22	NM_053152	+81,53
Killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 7	Klra7	NM_014194	+74,07
Matrix metallopeptidase 13	Mmp13	NM_008607	+66,37
<b>Herunterregulierte Gene**</b>			
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	Serpina3g	NM_009251	-3333,33
Chitinase 3-like 1	Chi3l1	NM_007695	-1666,66
Sulfatase 2	Sulf2	NM_028072	-434,78
Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	Islr	NM_012043	-333,33
Serum amyloid A 3	Saa3	NM_011315	-322,58
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked	Eif2s3y	NM_012011	-204,08
CD302 antigen	Cd302	NM_025422	-196,09
RNA imprinted and accumulated in nucleus	Rian	AK017440	-185,19
Insulin-like growth factor 2	Igf2	NM_010514	-175,44
Ring finger protein 113A2	Rnf113a2	NM_025525	-151,51

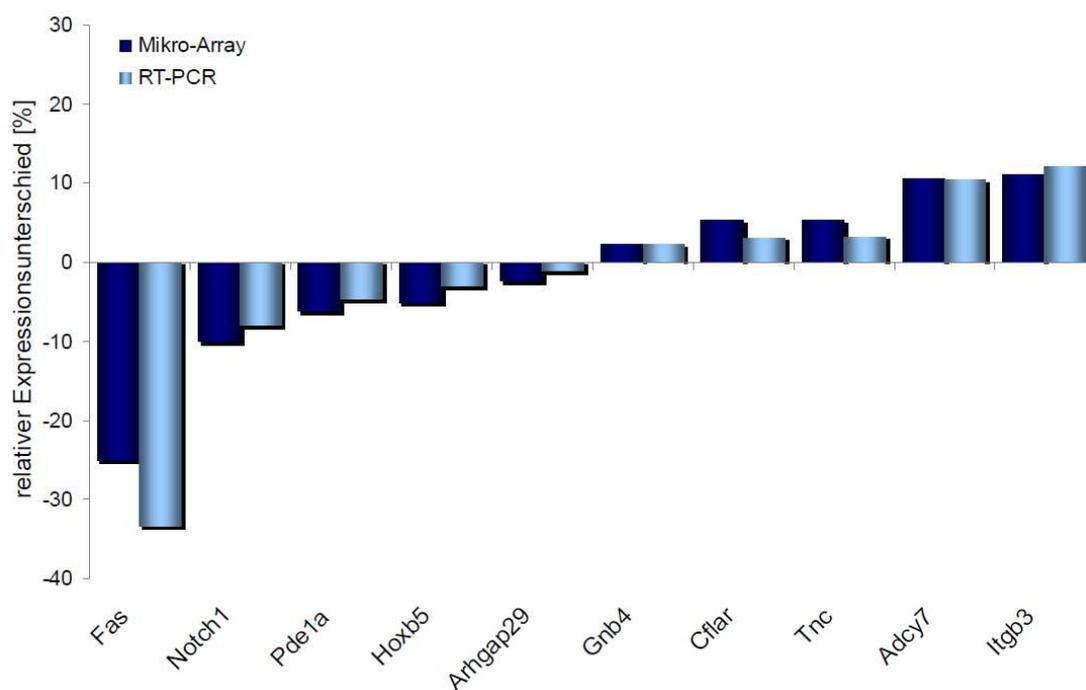
\*: FC, „**Fold Change**“; relativer Expressionsunterschied zur parentalen Zelllinie

\*\***: Exemplarisch sind die zehn am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene aufgelistet**

Auf die vollständige Auflistung der deregulierten Gene wird in dieser Arbeit verzichtet. In Tab. 4.4 sind jeweils zehn Gene benannt, deren Expression in der NIH3T3/CRB3A-Zelllinie im Vergleich zur parentalen Zelllinie am stärksten hoch- bzw. herunterreguliert ist.

### Validierung der Mikroarray-Daten durch quantitative RT-PCR

Um die Resultate der Mikroarray-Analyse zu validieren, wurden die relativen Expressionsunterschiede von zehn zufällig ausgewählten Genen mit Hilfe einer quantitativen PCR-Analyse (qRT-PCR) bestimmt. Ein Vergleich der relativen Expressionsunterschiede, die mit Hilfe der beiden Methoden ermittelt wurden, ist in Abb. 4.16 dargestellt.



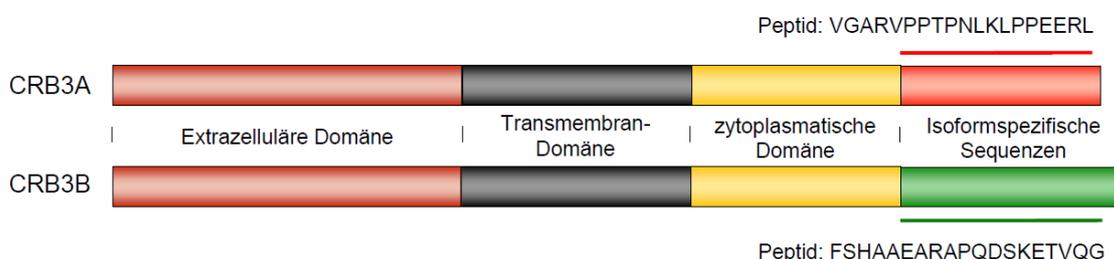
**Abb. 4.16:** Vergleich der relativen Expressionsunterschiede von zehn deregulierten Genen in parental und CRB3A-exprimierenden NIH3T3-Zellen. Die Expressionsunterschiede wurden durch quantitative RT-PCR ermittelt und mit den Daten der Mikro-Array-Analyse verglichen. Die offiziellen Bezeichnungen der analysierten Gene sind in Klammern aufgeführt: Fas (TNF receptor superfamily member 6), Notch (Notch gene homolog 1), Pde1a (phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent), Hoxb5 (Homeo box B5), Arhgap29 (Rho GTPase activating protein 29), Gnb4 (guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 4), Cflar (CASP8 and FADD-like apoptosis regulator), Tnc (tenascin), Adcy7 (Adenylate cyclase 7), Itgb3 (Integrin beta 3)

Die Ergebnisse beider Methoden zeigen eine sehr gute Übereinstimmung, so dass die mit der Mikroarray-Analyse ermittelten Expressionsunterschiede bestätigt werden konnten.

## 4.4 Studien zur Expression von CRB3 an humanen Mammakarzinom-Zelllinien

### 4.4.1 Herstellung von polyklonalen CRB3-Antikörpern

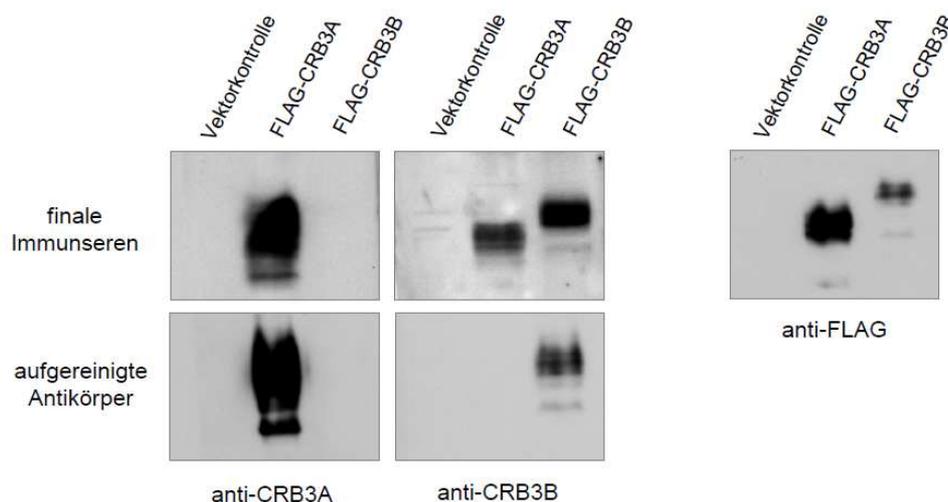
Für umfassende Analysen auf Ebene der Proteinexpression ist die Verfügbarkeit eines geeigneten Antikörpers Grundvoraussetzung. Um Expressionsstudien durchführen zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit polyklonale spezifische Antikörper gegen beide CRB3-Isoformen in Kaninchen hergestellt werden. Zunächst erfolgte die Auswahl möglicher Peptide für das Immunisierungsverfahren. Durch die Auswahl der Peptidsequenzen VGARVPPTPNLKLPEERL für CRB3A und FSHAAEARAPQDSKETVQG für CRB3B aus den isoform-spezifischen Bereichen am C-Terminus der Proteine sollte eine Kreuzreaktivität der generierten Antikörper mit der jeweils anderen CRB3-Isoform vermieden werden (Abb. 4.17).



**Abb. 4.17: Schematische Darstellung der Lage der zur Immunisierung eingesetzten CRB3A- und CRB3B-Peptide innerhalb der isoformspezifischen Sequenzbereiche.**

Homologien der ausgewählten Peptide mit anderen bekannten Proteinsequenzen wurden durch eine BLAST-Analyse ([www.ncbi.nlm.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST)) ausgeschlossen. Im Zuge dieser Analyse konnten keine Sequenzhomologien mit Einträgen der Datenbank festgestellt werden. Die chemische Kopplung der Peptide an das KLH-Protein (*keyhole limpet hemocyanin*) wurde durch das Anfügen eines zusätzlichen Cystein-Rests an den N-Terminus der Peptide angefügt. Die KLH-gekoppelten Peptide wurden dann zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (siehe 3.4.1). Um zu überprüfen, ob die Immunisierungen erfolgreich verlaufen sind, wurden die aus den Versuchstieren gewonnenen Antiseren zunächst im Western Blot

getestet. Im Anschluss daran erfolgte die affinitätschromatographische Aufreinigung der Immunsereen (siehe 3.4.2). Für die Western Blot Analysen wurden Zellysate von  $\psi$ nx-eco-Zellen verwendet, die transient mit einem FLAG-CRB3A- bzw. FLAG-CRB3B-Expressionskonstrukt transfiziert waren. Als Kontrolle erfolgte parallel ein Nachweis der Proteine mit FLAG-Antikörpern.



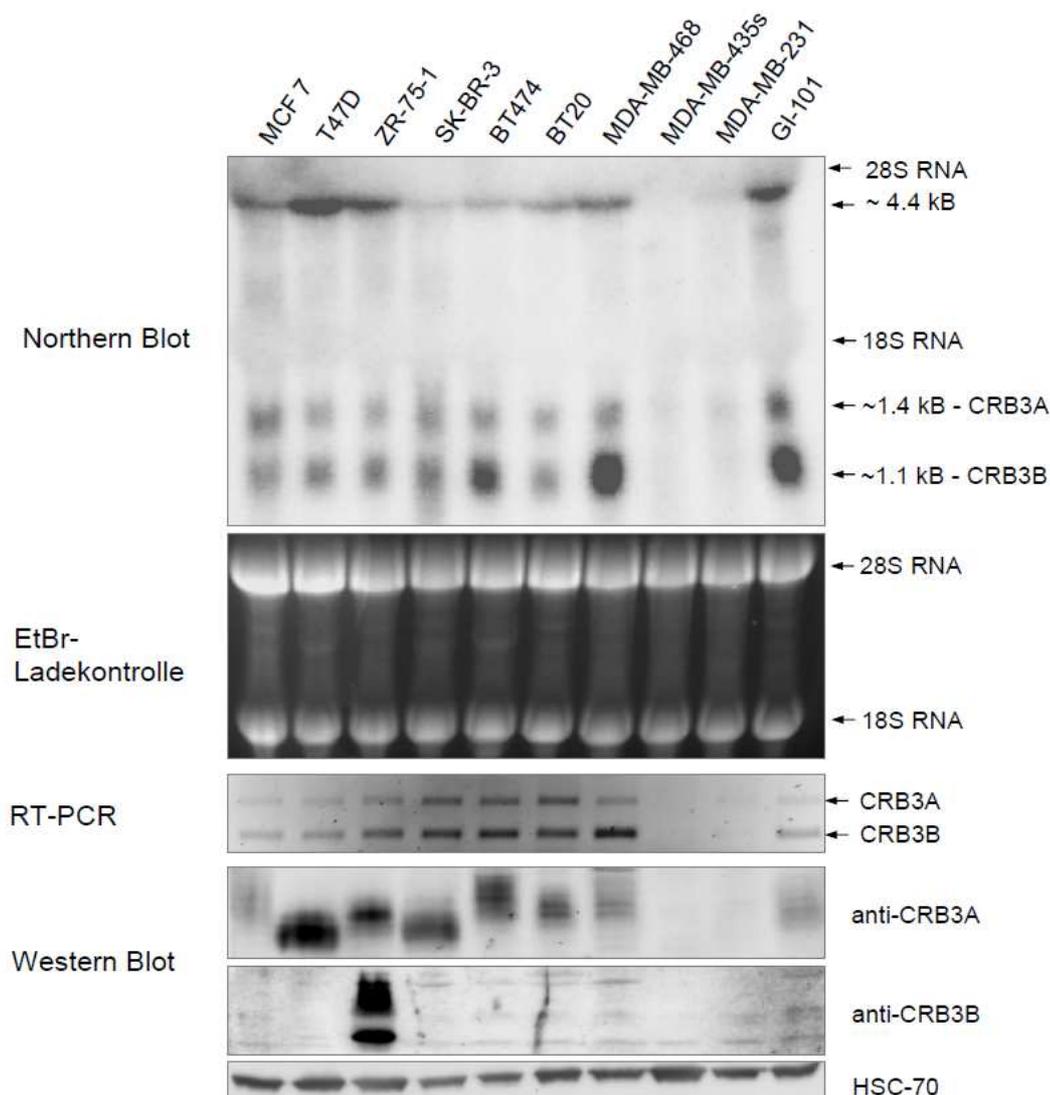
**4.18:** Die Reaktivität der hergestellten Antiseren (obere Reihe) und der affinitätschromatographisch aufgereinigten Antikörper (untere Reihe) gegen CRB3A und CRB3B wurde im Western Blot an transient exprimierten FLAG-Fusionsproteinen getestet. Die Detektion mit FLAG-Antikörpern diente als Kontrolle.

Sowohl das anti-CRB3A-Serum als auch die daraus aufgereinigten Antikörper zeigten eine starke und spezifische Reaktivität mit dem CRB3A-Protein im Western Blot (Abb. 4.18). Für das anti-CRB3B-Serum wurde zunächst eine Reaktivität mit beiden CRB3-Isoformen nachgewiesen. Aufgereinigte CRB3B-Antikörper zeigten dann aber eine spezifische Reaktivität mit dem CRB3B-Protein. Kreuzreagierende Antikörper wurden durch die Aufreinigung des Anti-CRB3B-Serums erfolgreich eliminiert.

#### 4.4.2 CRB3-Expression in humanen Mammakarzinom-Zelllinien

Um die CRB3-Expression in zehn humanen Mammakarzinom-Zelllinien auf mRNA- und Protein-Ebene zu bestimmen, wurden eine Northern Blot Analyse, eine RT-PCR-Analyse und Western Blot Analysen durchgeführt. Für die Northern Blot Analyse wurde die elektrophoretisch aufgetrennte und immobilisierte Gesamt-RNA der Mammakarzinom-Zelllinien mit einer radioaktiv-markierten, CRB3-

spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert. Für die RT-PCR-Analyse wurde zunächst die Gesamt-RNA der untersuchten Zelllinien in cDNA konvertiert. Zur Analyse der beiden CRB3-Transkripte erfolgte dann eine PCR mit Oligonukleotiden, die Amplicons mit ca. 800 Bp (CRB3A) und ca. 500 Bp (CRB3B) erzeugen. Für die Western Blot Analysen wurden NP-40-Zellysate zum Nachweis von CRB3A bzw. Ganzzellextrakte zum Nachweis von CRB3B und die hergestellten Antikörper gegen CRB3A und CRB3B eingesetzt.

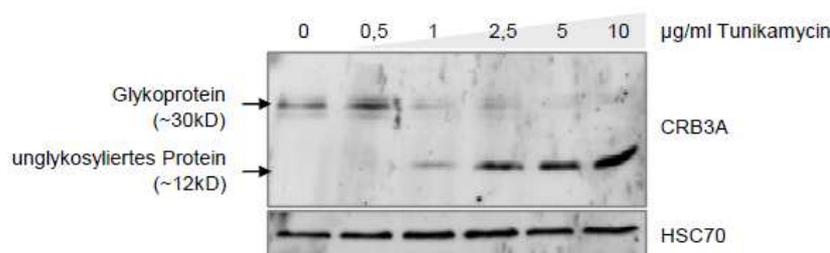


**Abb. 4.19:** Untersuchung der CRB3-Expression in zehn humanen Mammakarzinom-Zelllinien. Die Expression der beiden CRB3-Transkriptvarianten wurde anhand von Northern Blot (A) und RT-PCR-Analysen (B) nachgewiesen. Als Ladekontrolle für die Northern Blot Analyse wurde ein RNA-Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Nachweis der CRB3-Proteine (C) erfolgte mit CRB3A- bzw. CRB3B-Antikörper im Western Blot.

Aus den in Abb. 4.19 gezeigten Ergebnissen der Northern Blot Analyse ist ersichtlich, dass beide CRB3-Transkriptvarianten in allen untersuchten Zelllinien, mit

Ausnahme von MDA-MB-435s und MDA-MB-231, exprimiert werden. Dabei wurde für das CRB3A-Transkript eine gleichmäßige, für das CRB3B-Transkript hingegen eine differenzielle Expression in den Zelllinien nachgewiesen. Das ~4,4 kb große Transkript ist nicht CRB3-spezifisch. Wahrscheinlich repräsentiert dieses Transkript ein benachbartes Gen, das in entgegengesetzte Richtung transkribiert wird und dessen Sequenz sich mit dem CRB3-Gen überlappt [71]. Erstaunlicherweise korreliert die Expression der CRB3A- und CRB3B-Proteine nicht mit der Menge der CRB3A- und CRB3B-Transkripte. Beispielsweise zeigen T47D-Zellen eine starke, SK-BR-3 eine moderate, MCF-7 und GI-101 sogar eine relativ schwache Expression des CRB3A-Proteins, was nicht mit dem Expressionsmuster des CRB3A-Transkripts zur Deckung zu bringen ist. Noch gravierender fällt diese Diskrepanz für CRB3B aus, denn das CRB3B-Protein wurde mit Ausnahme von ZR-75-1 in keiner der untersuchten Zelllinien nachgewiesen. Weitere Untersuchungen zur Problematik der CRB3B-Proteinexpression werden in Kapitel 4.6 zusammengefasst.

Wie in Abb. 4.19 auch zu erkennen ist, exprimieren die verschiedenen Zelllinien das CRB3A-Protein mit variierendem Molekulargewicht (MW). Diese Größenunterschiede sind möglicherweise auf eine Zelltyp-spezifische N-Glykosylierung des Proteins zurückzuführen. Um das zu überprüfen, wurden die Zelllinien T47D, BT-20 und SK-BR-3 einer Tunikamycin-Behandlung unterworfen, was eine Inhibition der N-Glykosylierung neusynthetisierter Proteine bewirkt. Effekte auf die CRB3A-Proteinexpression wurden anschliessend im Western Blot analysiert. In Abb. 4.20 ist stellvertretend das Resultat für T47D-Zellen dargestellt.



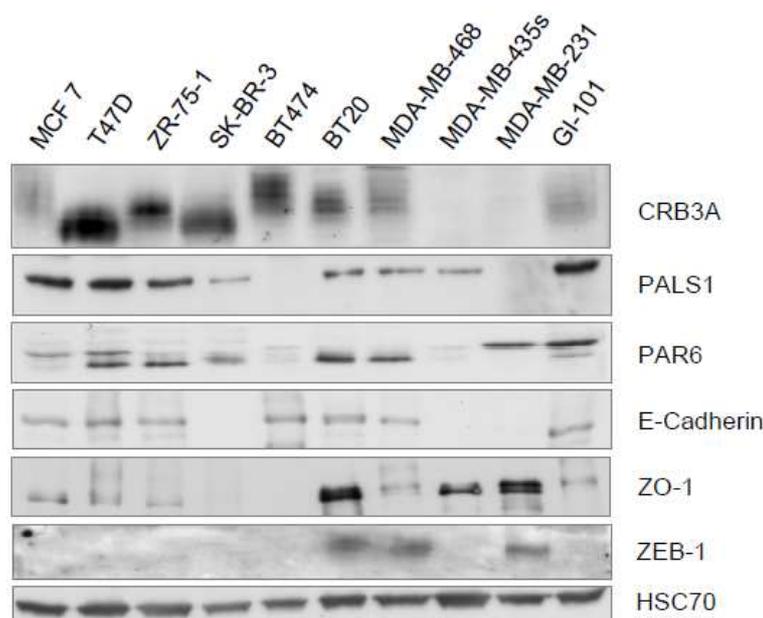
**Abb. 4.20:** Nachweis der CRB3A-Glykosylierung durch Behandlung mit Tunikamycin, stellvertretend dargestellt für T47D-Zellen. Mit steigender Tunikamycin-Konzentration wird die Glykosylierung des CRB3A-Proteins zunehmend inhibiert. Das Glykoprotein besitzt ein Molekulargewicht von ca. 30kD, das unglykosylierte Protein von ca. 12kD.

In Abhängigkeit von der Tunikamycin-Konzentration wurde ein „Shift“ des CRB3A-spezifischen Signals von ca. 30 kD zu 12 kD erzielt, was der Größe des unmodifizierten Proteins entspricht. Für SK-BR-3 und BT-20-Zellen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Ein Vergleich der Western Blot Analysen ergab, dass die Größe des unglykosylierten CRB3A-Proteins in den untersuchten Zelllinien mit jeweils 12 kD tatsächlich identisch ist. Die beobachteten Unterschiede im CRB3A-Molekulargewicht sind demnach auf eine variable N-Glykosylierung des CRB3A-Proteins in den Zelllinien zurückzuführen.

#### **4.4.3 Die Expression von Zellpolaritäts- und Zelladhäsionsproteinen in Mammakarzinom-Zelllinien**

Im Hinblick auf weiterführende funktionelle Studien wurden zunächst umfangreiche Western Blot Analysen zur genaueren Charakterisierung der Mammakarzinom-Zelllinien durchgeführt. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde die Expression der CRB3A-Interaktionspartner PALS1 und Par6, der beiden Zelladhäsionsproteine E-Cadherin und ZO-1, sowie des Transkriptionsfaktors ZEB-1 untersucht. Es galt zu klären, ob möglicherweise eine deregulierte Expression von PALS1 und Par6 in den Karzinomzellen vorliegt, was mit dem Verlust der CRB3A-Funktion assoziiert sein könnte. Des Weiteren drängte sich die Frage nach einer Korrelation zwischen den Expressionsprofilen von CRB3A und ZEB-1 auf, denn an MDA-MB-231 durchgeführte Promotorstudien ergaben, dass ZEB-1 als Suppressor epithelialer Zelladhäsions- und Zellpolaritätsgene, darunter E-Cadherin, CRB3A und PALS1, fungiert [39].

Zur Durchführung der Western Blot Analysen wurden Ganzzellextrakte der Mammakarzinom-Zelllinien eingesetzt und Antikörper gegen PALS1, Par6 (St. Cruz), E-Cadherin, ZO-1 und ZEB-1 zum Nachweis der Proteine verwendet. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen sind zusammen mit dem CRB3A-Immunoblot (siehe 4.4.2, Abb. 4.19) in Abb. 4.21 dargestellt.



**Abb. 4.21: Western Blot Analysen zum Nachweis der Zellpolaritätsproteine CRB3A, PALS1 und Par6, sowie der Zelladhäsionsproteine E-Cadherin und ZO-1 und des Transkriptionsfaktors ZEB-1 in humanen Mammakarzinom-Zelllinien.**

Mit Ausnahme von BT-474 und MDA-MB-231 exprimieren alle untersuchten Zelllinien sowohl PALS1 als auch Par6. Die vom Par6-Antikörper detektierten Doppelbanden sind auf die Expression zweier fast identischer Par6-Isoformen zurückzuführen, deren Größenunterschiede nur marginal sind. Die für E-Cadherin und ZO-1 ermittelten Expressionsprofile entsprechen bisher publizierten Daten [93, 94]. Das ZEB-1 Protein konnte in den Zelllinien BT-20, MDA-MB-468 und MDA-MB-231 nachgewiesen werden.

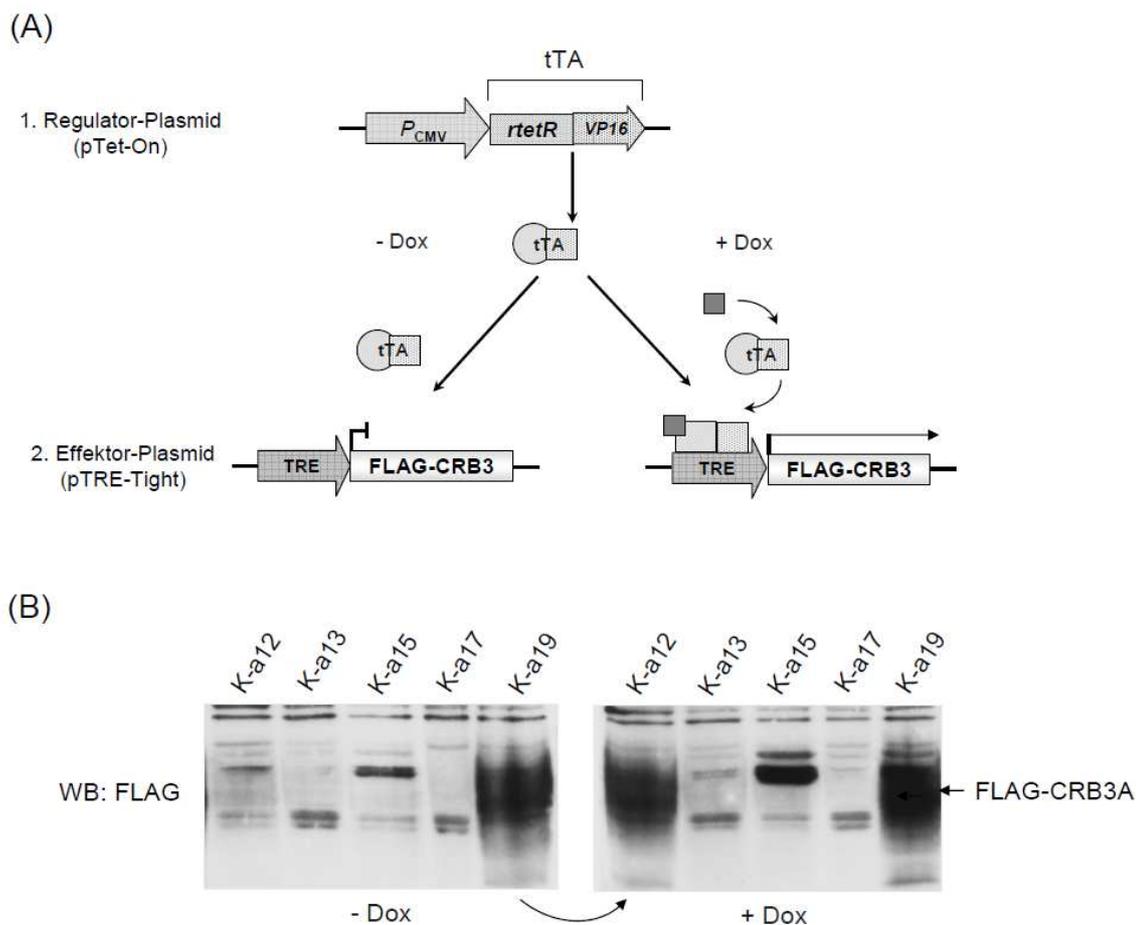
#### **4.5 Untersuchung der CRB3A-Signalwege in MCF-7 Zellen**

In weiterführenden Untersuchungen galt das Interesse den CRB3A-assoziierten Signalwegen die an der malignen Entartung von Mammakarzinom-Zellen beteiligt sind. In Anlehnung an die zuvor gewonnenen Erkenntnisse der CRB3A-induzierten Transformation von NIH3T3-Fibroblasten, sollte untersucht werden, ob die CRB3A-Par6-Signalkaskade auch in Mammakarzinom-Zellen aktiviert ist. Wie in mehreren Publikationen bereits beschrieben wurde, ist die Funktion von CRB3A bei starker Überexpression in Zellen epithelialen Ursprungs beeinträchtigt oder geht verloren [71, 86, 87]. Unter Berücksichtigung der in 4.4.3 erstellten Expressionsprofile wurde die Zelllinie MCF-7 als Modellsystem für weiterführende

Studien ausgewählt. MCF-7-Zellen besitzen eine schwache endogene CRB3A-Expression, was eine Grundvoraussetzung für Untersuchungen CRB3A-vermittelter Effekte in Abhängigkeit von dessen Expressionsstärke ist. Eine elegante Methode zur regulierbaren Expression eines Gens stellt das TetOn-Genexpressionssystem dar. Das Prinzip basiert auf der sequenziellen Expression zweier Plasmide, die stabil in das Genom der Zielzellen integriert sind. Das erste Regulator-Plasmid exprimiert konstitutiv einen Transaktivator (tTA), der wiederum in Anwesenheit von Doxyzyklin (Dox; Tetrazyklin-Derivat) an ein responsives Element (TRE) in der inaktiven Promotorregion des zweiten Effektor-Plasmids bindet, welches für das Gen von Interesse kodiert (siehe auch Abb. 4.22, A). Durch die so erzielte Aktivierung des Promotors wird die Expression des Zielgens initiiert. Die Stärke der induzierten Genexpression wird dabei über die verabreichte Doxyzyklin-Konzentration reguliert. Die Etablierung dieses Modellsystems sollte die Untersuchung CRB3A-assoziiierter Effekte bei unterschiedlich starker Expression des Gens in MCF-7 Zellen ermöglichen.

#### **4.5.1 Stabile Transfektion von MCF-7 Tet-On Zellen zur induzierbaren CRB3A-Expression**

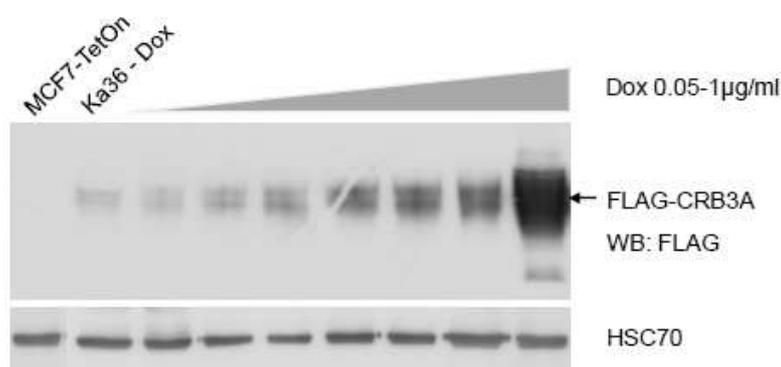
MCF-7 TetOn Zellen wurden von der Firma Clontech bezogen. Diese Zelllinie wurde vom Hersteller bereits stabil mit dem Regulator-Plasmid (pTet-On) transfiziert. Im Zuge einer zweiten stabilen Transfektion wurde das Effektor-Plasmid (pTRE-Tight, Clontech), welches für N-terminal getaggetes FLAG-CRB3A kodiert, in die Zellen eingebracht. Zellklone wurden durch Zugabe von Geneticin (pTet-On) und Puromycin (pTRE-Tight) doppelt selektioniert, expandiert und hinsichtlich der induzierbaren Expression des Transgens analysiert (siehe 3.2.8). Hierfür erfolgte eine 48-stündige Inkubation der Zellklone mit 1 µg/ml Doxyzyklin im Kulturmedium. Parallel dazu wurden jeweils unbehandelte Zellen als Kontrollen mitgeführt. Anschließend hergestellte NP-40 Zellextrakte wurden für Western Blot Analysen zum spezifischen Nachweis der FLAG-CRB3A-Expression mittels FLAG-Antikörper (Sigma) eingesetzt.



**Abb. 4.22: (A)** Das Prinzip des TetOn-Genexpressionssystems schematisch dargestellt. Bei Anwesenheit von Doxyzyklin (Dox) bindet der Transaktivator (tTA) an das responsive Element (TRE) im Promotor des Effektor-Plasmids und induziert die Transkription des Zielgens. **(B)** Repräsentative Western Blot Analysen zur Identifizierung responsiver MCF-7 TetOn/CRBA Zellklone. Zellklon K-a12 zeigte eine Dox-induzierte FLAG-CRB3A-Expression, Zellklon K-a19 exprimiert das Transgen hingegen Dox-unabhängig.

Anhand der Western Blot Analysen, die exemplarisch für jeweils fünf der untersuchten Zellklone in Abb. 4.22, B dargestellt sind, konnten insgesamt drei Zellklone identifiziert werden, die eine Doxyzyklin-induzierte Expression von FLAG-CRB3A aufwiesen. Ein weiterer Zellklon (K-a19; Abb.4.22, B) exprimiert das Protein auch ohne Zusatz von Doxyzyklin.

Um die Sensibilität und Regulierbarkeit des Expressionssystems zu überprüfen wurde anschließend ein responsiver Zellklon (K-a36) zur Erstellung einer „Induktionskurve“ ausgewählt. Hierfür wurde das Kulturmedium der Zellen für 48 h mit jeweils 0 / 0,05 / 0,1 / 0,2 / 0,3 / 0,4 / 0,5 / 1 µg/ml Doxyzyklin supplementiert. Die FLAG-CRB3A-Expression wurde anschließend im Western Blot mittels FLAG-M2-Antikörper analysiert.

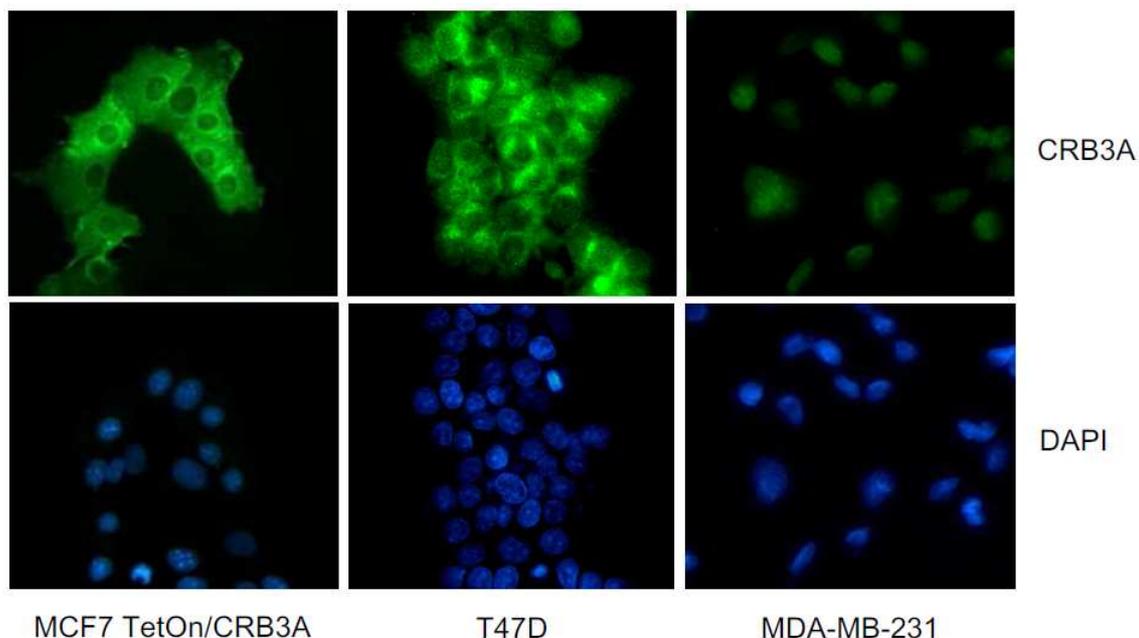


**Abb. 4.23:** Induktionskurve zur Überprüfung der regulierbaren FLAG-CRB3A-Expression in MCF-7 TetOn/CRB3A-Zellen (Ka36). Der Proteinnachweis erfolgte mittels FLAG-Antikörper, HSC-70 diente als Ladekontrolle. Das Niveau der FLAG-CRB3A-Expression nimmt mit steigender Doxyzyklin-Konzentration zu. MCF-7 TetOn-Zellen, die nicht mit dem CRB3A-Expressionsplasmid transfiziert waren, dienten als Kontrollen.

Wie Abbildung 4.23 zeigt, erfolgte die Induktion der CRB3A-Expression in der MCF-7 TetOn/CRB3A-Zelllinie in Abhängigkeit von der eingesetzten Doxyzyklin-Konzentration. Die Zellen weisen ohne Doxyzyklin eine leichte Expression des Transgens auf, was auf die Grundaktivität des induzierbaren Promotors im pTRE-Tight-Expressionsplasmid zurückzuführen ist. Mit 0,05 bis 0,5 µg/ml Doxyzyklin wird eine kontinuierlich ansteigende Expression erzielt. Bei einer Konzentration von 1 µg/ml Doxyzyklin wird eine starke CRB3A-Überexpression induziert.

#### 4.5.2 CRB3A ist intrazellulär lokalisiert in Mammakarzinom-Zelllinien

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass ein intrazelluläres CRB3A-Protein für die maligne Transformation von NIH3T3-Zellen verantwortlich ist, sollte die subzelluläre Lokalisation des Proteins in Mammakarzinom-Zellen analysiert werden. Immunzytochemische Fluoreszenzfärbungen wurden an den Zelllinien MCF-7 TetOn/CRB3A, T47D und MDA-MB-231-Zellen unter Verwendung des CRB3A-spezifischen Primärantikörpers und eines Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpers vorgenommen. Dabei wurde in MCF-7 TetOn/CRB3A Zellen transient überexprimiertes und in T47D-Zellen endogen exprimiertes CRB3A-Protein detektiert. CRB3-negative MDA-MB-231-Zellen dienten als Kontrollen.



**Abb. 4.24:** Die immunzytochemische Detektion der subzellulären CRB3A-Lokalisation in humanen Mammakarzinom-Zelllinien, durchgeführt mit CRB3A-spezifischen Antikörpern. Sowohl für transient überexprimiertes CRB3A-Protein in MCF-7 Zellen, als auch für endogen exprimiertes CRB3A-Protein in T47D-Zellen wurde eine zytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen. MDA-MB-231 Zellen dienen als Negativkontrolle. Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung visualisiert.

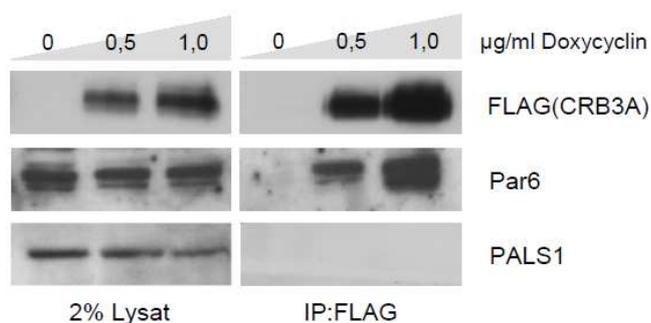
Sowohl für MCF-7 als auch für T47D-Zellen wurde ausschließlich eine zytoplasmatische Lokalisation des CRB3A-Proteins nachgewiesen (siehe Abb. 4.24). Die Färbung der MDA-MB-231-Zellen zeigt erwartungsgemäß keine Signale. Dass eine zytoplasmatische Sortierung des CRB3A-Proteins in MCF-7 durch die transiente Überexpression des Transgens verursacht wird, kann dabei ausgeschlossen werden. Das für T47D-Zellen erzielte Resultat belegt, dass auch endogen exprimiertes CRB3A in Mammakarzinom-Zellen zytoplasmatisch lokalisiert ist. Diese Befunde bestätigen, dass die intrazelluläre Sortierung des CRB3A-Proteins eine Rolle bei der malignen Entartung von Zellen spielt und die durch intrazelluläres CRB3A induzierten Signalwege der onkogenen Transformation auch in Mammakarzinom-Zellen eine wichtige Rolle spielen könnten.

#### 4.5.3 Identifizierung von CRB3A-Bindungspartnern in MCF-7 Zellen

Zur Aufdeckung der CRB3A-Signalwege in Mammakarzinom-Zellen wurden Bindungsstudien am Modell der MCF-7 TetOn/CRB3A-Zellen durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob eine Varianz der CRB3A-Expression Auswirkungen

auf die Interaktion mit anderen Proteinen und die Aktivierung potenzieller „*downstream*“-Effektoren hat.

Mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen sollte zunächst untersucht werden, ob für MCF-7 Zellen eine direkte Interaktion zwischen CRB3A und PALS1 bzw. Par6 nachgewiesen werden kann. Es wurden Zellextrakte aus MCF-7 TetOn/CRB3A angefertigt, in denen die Expression des Transgens mit jeweils 0,5 und 1 µg/ml Doxzyklin induziert wurde. Die Immunpräzipitation der FLAG-CRB3A-Fusionsproteine und daran gebundener Proteine erfolgte unter Verwendung des ANTI-FLAG®M2 Affinitätsgels von Sigma. Der Nachweis (co-)präzipitierter Proteine erfolgte in Western Blot Analysen mittels PALS1- und Par6-spezifischer Antikörper.



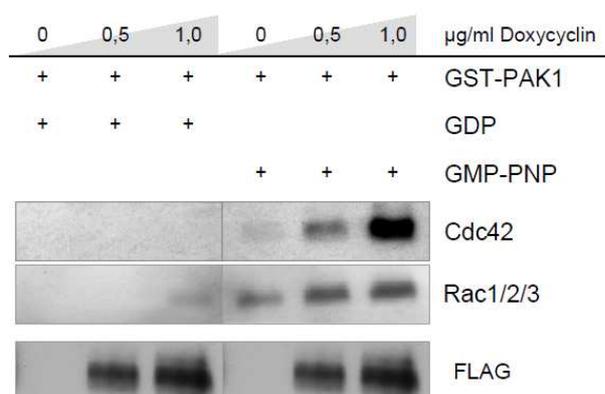
**Abb. 4.25: Identifizierung von direkten Bindungspartner bei unterschiedlich starker CRB3A-Expression mittels Western Blot Analysen von Co-IPs mit MCF-7 TetOn/CRB3A-Zellen. Die FLAG-CRB3A-Expression wurde durch 0,5 und 1 µg/ml Doxzyklin in DMEM induziert. Die Co-Präzipitation von Par6 korreliert mit dem Anstieg der FLAG-CRB3A-Expression. Das PALS1-Protein wurde nicht co-präzipitiert.**

Als direkter CRB3A-Bindungspartner in MCF-7 Zellen wurde Par6 identifiziert. Aus Abb. 4.25 ist ersichtlich, dass eine Korrelation zwischen dem Anstieg der CRB3A-Expression und der Menge des co-präzipitierten Par6-Proteins besteht. Anhand der Western Blots ist zu erkennen, dass die Gesamtexpression des Par6-Proteins dabei nicht von einer stärkeren CRB3A-Expression beeinflusst wird. Eine Interaktion zwischen CRB3A und PALS1 konnte mit Hilfe der durchgeführten Co-IPs nicht nachgewiesen werden.

#### **4.5.4 Untersuchung der CRB3A-vermittelten Aktivierung von Cdc42 und Rac1/2/3 in MCF-7 Zellen**

Um zu überprüfen ob die Bindung von Par6 an CRB3A auch in MCF-7 Zellen zur dosisabhängigen Aktivierung von Cdc42 und Rac1/2/3 führt, wurden GTPase-

Aktivierungsassays durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Expression von CRB3A in MCF-7 TetOn/CRB3A-Zellen mit 0,5 bzw. 1 µg/ml Doxzyklin im Kulturmedium induziert und anschließend hergestellte Zellextrakte zur Durchführung der GTPase-Aktivierungsassays verwendet. In Analogie zu den unter 4.2.4 ausführlich beschriebenen „*Pulldown*“-Assays, wurde GST-PAK1 als Bindungspartner für aktiviertes, d.h. GTP-gebundenes Cdc42 und Rac1/2/3 eingesetzt. Die Grundaktivität der GTPasen sollte in Anwesenheit von GDP ermittelt und eine Akkumulation der aktivierten Cdc42- und Rac-Proteine durch Zusatz von GMP-PNP erzielt werden. Auf die Anfertigung von Kontrollansätzen mit GST-Protein wurde an dieser Stelle verzichtet (Abb. 4.26). Die aus den untersuchten Zelllinien präzipitierten Proteine wurden durch Western Blot Analysen mittels Cdc42- und Rac1/2/3-spezifischer Antikörper detektiert.



**Abb. 4.26:** Ermittlung der Cdc42- und Rac1/2/3-Aktivierungszustände in Abhängigkeit von der CRB3A-Expressionsmenge in MCF-7 Zellen. Dargestellt ist die Zusammensetzung der „*Pulldown*“-Ansätze und Western Blot Analysen zum Nachweis der präzipitierten Cdc42- und Rac1/2/3-Proteinmengen. In Abhängigkeit von der CRB3A-Expression kam es zur vermehrten Akkumulation aktiver Cdc42- und Rac1/2/3-Proteine (GST-PAK1/GMP-PNP). Für Rac1/2/3 war zudem eine leicht gesteigerte Grundaktivität (GST-PAK1/GDP) zu beobachten.

Die Expression von CRB3A führt zur dosisabhängigen Aktivierung der kleinen RhoGTPasen Cdc42 und Rac1/2/3 in MCF-7 Zellen. Während eine Zunahme der Grundaktivität nur für Rac1/2/3 zu nachzuweisen war, konnte sowohl für Cdc42 als auch für Rac1/2/3 eine mit der gesteigerten CRB3A-Expression einhergehende Akkumulation der aktivierten Proteine erzielt werden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Signalkaskade der CRB3A-vermittelten Transformation von NIH3T3-Zellen auch in Mammakarzinom-Zellen aktiviert ist und zur malignen Entartung der Zellen beiträgt.

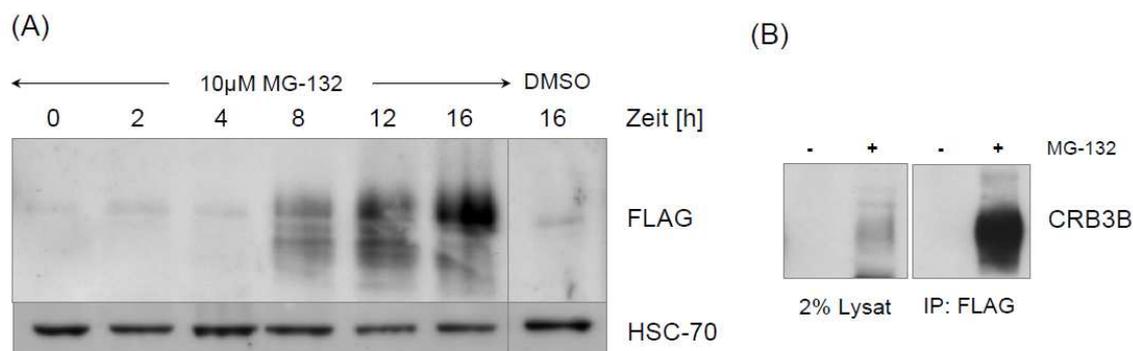
## 4.6 Untersuchungen zur Expression des CRB3B-Proteins

Sowohl die Studien an NIH3T3-Zellen als auch die Expressionsanalysen an humanen Mammakarzinom-Zelllinien warfen Fragen bezüglich der Expression des CRB3B-Proteins auf. Für NIH3T3-Zellen, die stabil mit einem CRB3B-kodierenden Expressionsplasmid transfiziert waren, konnte ein Nachweis der CRB3B-Expression auf transkriptioneller, nicht aber auf Proteinebene erbracht werden. Mit humanen Mammakarzinom-Zelllinien angestellte Expressionsanalysen ergaben ähnliche Befunde. Das CRB3B-Protein konnte lediglich in einer Zelllinie nachgewiesen werden, obwohl acht der zehn untersuchten Zelllinien die CRB3B-Transkriptvariante eindeutig exprimierten. Diese Beobachtungen ließen die Schlussfolgerung zu, dass eine Regulation der CRB3B-Expression auf Ebene des Proteins erfolgen muss. Eine Rolle könnte dabei die isoformspezifische C-terminale Proteindomäne spielen. Ein innerhalb dieser Aminosäuresequenz gelegenes Lysin könnte möglicherweise als Substrat für die Ubiquitylierung des Proteins dienen und somit die proteasomale Degradation des Proteins vermitteln. Diese Möglichkeit sollte zunächst am Expressionsverhalten einer NIH3T3/CRB3B-Zelllinie nach Einsatz eines spezifischen Proteasomen-Inhibitors untersucht werden.

### 4.6.1 Untersuchungen zur Stabilität des CRB3B-Proteins

Mit Hilfe des Proteasomen-Inhibitors MG-132 kann die Ubiquitin-vermittelte Proteindegradation blockiert werden, was die Akkumulation zahlreicher Proteine in den Zellen zur Folge hat. NIH3T3/CRBB-Zellen (siehe 4.1.3) wurden für jeweils 0, 2, 4, 8, 12 und 16 h mit 10  $\mu$ M MG-132 im Kulturmedium inkubiert und Zelllysate zur Durchführung von Western Blot Analysen hergestellt. Nach 16-stündiger MG-132-Behandlung wurde zusätzlich eine Immunpräzipitation unter Verwendung des ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2 Affinitätsgels (Sigma) durchgeführt. Als Kontrollen dienten hierbei DMSO-behandelte NIH3T3/CRB3B-Zellen. Der Nachweis des FLAG-CRB3B-Proteins erfolgte anschließend in Western Blot Analysen mittels FLAG- und CRB3B-spezifischer-Antikörper.

Die über die Dauer der MG-132-Behandlung steigenden Signale im Western Blot (Abb. 4.27, A) zeigen, dass es durch eine blockierte Proteindegradation zur Akkumulation des FLAG-CRB3B-Proteins in den Zellen kommt.



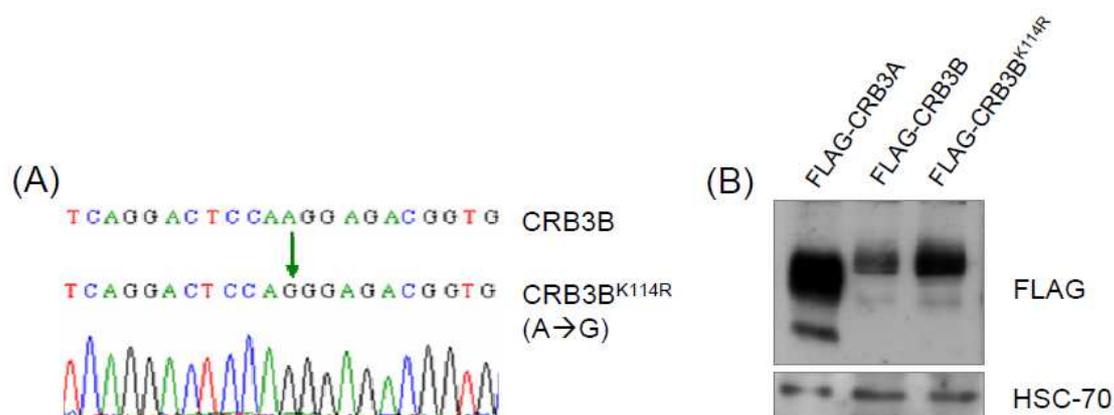
**Abb. 4.27: Nachweis der FLAG-CRB3B-Expression nach MG-132-Behandlung stabil transfizierter NIH3T3/CRB3B-Zellen. (A) In Abhängigkeit von der Behandlungsdauer kommt es nachweisbar zur Steigerung der FLAG-CRB3B-Proteinmenge, als Ladekontrolle diente HSC-70. (B) Das akkumulierte FLAG-CRB3B-Protein wurde nach der MG-132-Behandlung immunpräzipitiert und im Western Blot nachgewiesen.**

Wie in Abb. 4.27, B zu sehen ist, konnte das CRB3B-Protein ausschließlich aus MG-132-behandelten und nicht aus unbehandelten NIH3T3/CRB3B-Zellen präzipitiert werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass die CRB3B-Expression über die proteasomale Degradation des Proteins reguliert wird. Ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf die Ubiquitylierung des C-terminalen Lysin-Restes zurückzuführen sind, sollte anschließend mit Hilfe von Mutationsstudien geklärt werden.

#### 4.6.2 Mutationsstudien zur Untersuchung einer Ubiquitin-vermittelten Degradation des CRB3B-Proteins

Der Einbau einer zielgerichteten Punktmutation in die CRB3B-kodierende Sequenz erfolgte mittels PCR. Hierfür wurde die FLAG-CRB3-cDNA zunächst in den pBlueskript-SKII-Vektor inkloniert, und dieses Konstrukt als Template für die Mutagenese-PCR (siehe 3.3.17) verwendet. Für die vollständige Amplifikation des Plasmids wurden zwei komplementäre Primer eingesetzt, welche die gewünschte Mutation trugen (siehe Tab. 7.6). In Folge der eingeführten Punktmutation kommt es zum Austausch der Aminosäure Lysin gegen Arginin an Position 114 im CRB3B-Protein. Der erfolgreiche Einbau der Mutation wurde durch eine DNA-Sequenzanalyse überprüft und die mutierte FLAG-CRB3-cDNA (siehe Abb. 4.26, A) anschließend zur Durchführung weiterer Analysen in das pIRES-Expressionsplasmid umklontiert. Die CRB3B-Mutante wird im Folgenden als CRB3B<sup>K114R</sup> bezeichnet.

Um mögliche Auswirkungen auf die Expression des CRB3B-Proteins aufzudecken, wurden  $\psi$ nx eco-Zellen transient mit Expressionplasmiden, die für N-terminal FLAG-getaggte CRB3A-, CRB3B-bzw. CRB3B<sup>K114R</sup>-Fusionsproteine kodierten, transfiziert und die Expression der Proteine anschließend im Western Blot durch Verwendung FLAG-spezifischer Antikörper analysiert.



**Abb. 4.28:** Die Einführung einer Punktmutation führt zum Austausch von Lysin durch Arginin an Position 114 (A). Für die mutierte CRB3B-Variante wurde im Western Blot nach transienter Expression in  $\psi$ nx-eco-Zellen ein stärkeres Signal detektiert als für Wildtyp-CRB3B (B).

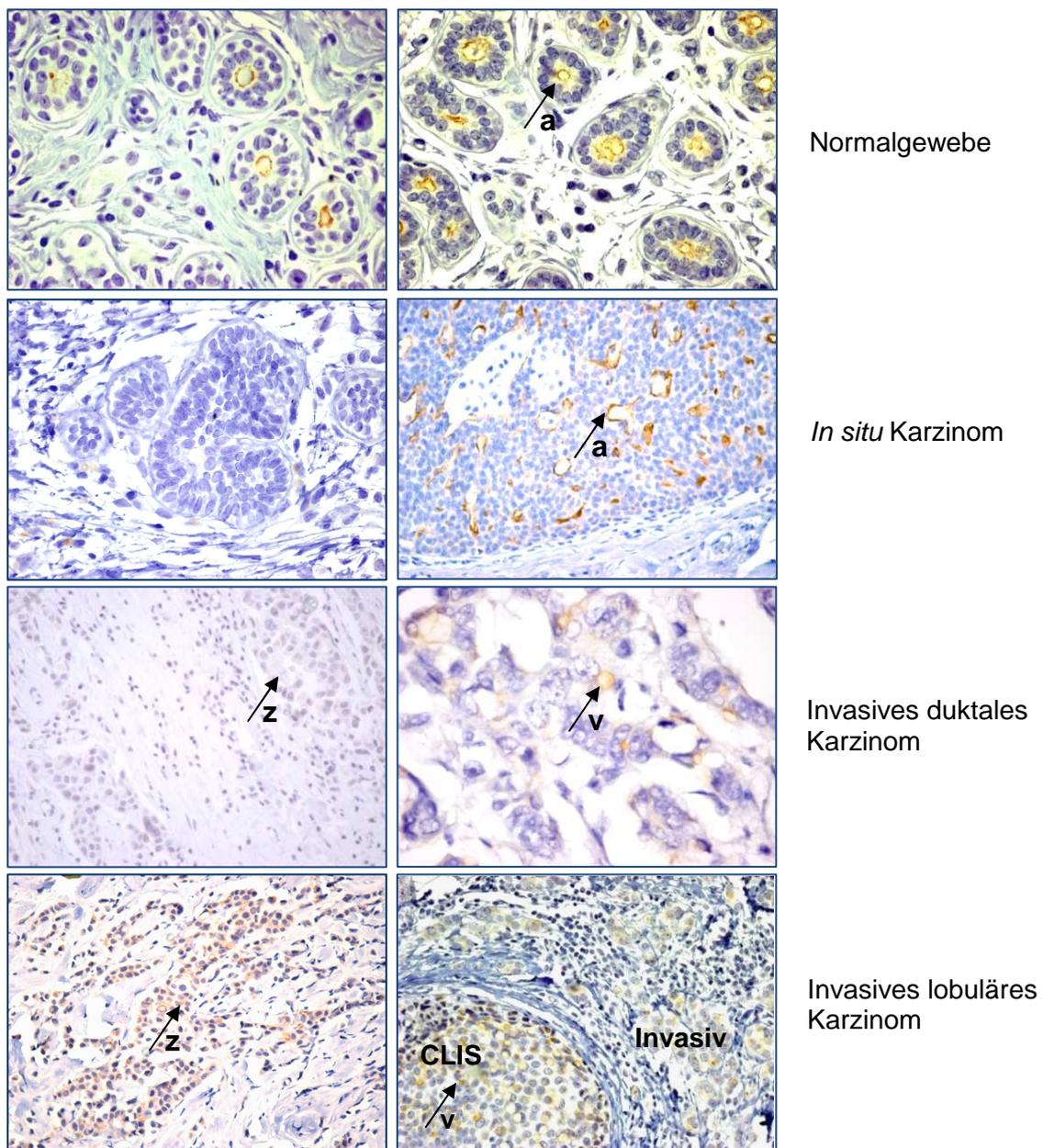
Verglichen mit Wildtyp-CRB3B konnte für die CRB3B<sup>K114R</sup>-Mutante eine stärkere Expression nachgewiesen werden (siehe Abb.4.28). Die Eliminierung des Lysin-Rests hatte somit durchaus einen stabilisierenden Effekt, doch trotz Einführung dieser Mutation weist das CRB3B-Protein bei identischen Transfektionsbedingungen nach wie vor eine schwächere Expression auf als das CRB3A-Protein. Die hier gezeigten preliminären Ergebnisse deuten auf eine Ubiquitin-vermittelte Regulation der CRB3B-Expression hin.

#### 4.7 CRB3A-Expression in Mammakarzinomen und Normalgeweben

Die CRB3A-Proteinexpression in humanen Mammakarzinomen wurde mit Hilfe der Immunhistochemie an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben von 42 Patientinnen (siehe 3.4.10) unter Verwendung des aufgereinigten CRB3A-spezifischen Antikörpers untersucht. Beispiele für mikroskopische Aufnahmen der Immunfärbungen sind in Abb. 4.29 dargestellt.

Im Einklang mit seiner Funktion als apikal sortiertes Zellpolaritätsprotein wird das

CRB3A-Protein im Normalgewebe der Mamma ausschließlich an der apikalen Membran epithelialer, luminaler Zellen exprimiert. Wie die Ergebnisse der Immunfärbungen eindrucksvoll belegen, geht dieses CRB3A-Expressionsmuster in Mammakarzinomen verloren. Eine residuale apikale Lokalisation des CRB3A-Proteins konnte in in situ-Karzinomen und invasiven Tumoren nur noch in Arealen mit primitiver drüsiger Differenzierung nachgewiesen werden. Stattdessen zeigten einige Tumorzellen eine diffuse zytoplasmatische Färbung oder eine Akkumulation des CRB3A-Proteins in Vakuolen.



**Abb. 4.29:** Immunhistologischer Nachweis der CRB3A-Expression in normalen und malignen Geweben der Mamma. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen bei 250- und 400-facher Vergrößerung. Die Pfeile indizieren eine CRB3A-Expression. CLIS: lobuläres Karzinoma in situ; a: apikale, v: vakuoläre, z: zytoplasmatische CRB3A-Färbung.

Immunreaktionen im Zytoplasma und in Vakuolen wurden bei *in situ* Karzinomen seltener beobachtet.

Generell zeigten duktale Karzinome häufiger eine residuale apikale Expression des CRB3A-Proteins als lobuläre Karzinome. Zytoplasmatische Immunreaktionen traten hingegen in beiden Karzinom-Typen mit annähernd gleicher Häufigkeit auf. In Tab. 4.5 ist die Auswertung der CRB3A-Immunfärbungen in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern und die verschiedenen Lokalisationen des CRB3A-Proteins in Zellen dargestellt.

**Tab. 4.5: CRB3-Expression in Mammakarzinomen**

Tumor Klassifizierung	Fälle n=	apikale Membran				Zytoplasma				Vakuolen			
		0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++
<b>Histol. Typ</b>													
Duktal	20	8	5	3	4	13	5	1	1	17	0	2	1
Lobulär	14	11	1	1	1	7	4	2	1	10	1	1	2
anderer	6	2	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>Grading</b>													
1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	28	14	4	5	5	17	7	3	1	22	1	3	2
3	9	6	2	1	0	5	3	0	1	8	0	0	1
<b>Tumorstadium</b>													
1	15	5	3	5	2	10	5	0	0	14	0	1	0
2	17	10	4	0	3	10	2	3	2	13	1	1	2
3	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>Lymphknotenstatus</b>													
positiv	17	7	4	5	1	13	2	2	0	9	0	0	1
negativ	19	11	2	2	4	10	6	1	2	14	1	3	1
<b>ER</b>													
positiv	34	18	6	6	4	22	9	2	1	28	1	3	2
negativ	3	2	0	1	0	2	0	0	1	2	0	0	1
<b>PR</b>													
positiv	36	20	6	6	4	23	9	2	2	29	1	3	3
negativ	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>HER2</b>													
0	14	7	1	4	2	11	3	0	0	11	1	1	1
1+	11	4	3	3	1	7	2	1	1	9	0	1	1
2+	5	2	2	0	1	4	1	0	0	0	0	1	0
3+	7	0	0	0	0	2	3	1	1	0	0	0	1

\*: zelluläre Lokalisation der Immunfärbung; 0: keine, +: schwache, ++: mäßige, +++: starke CRB3A-Expression

In mehr als der Hälfte aller untersuchten Mammakarzinome wurde eine intrazelluläre Lokalisation des CRB3A-Proteins in den Tumorzellen beobachtet. Dabei deutete sich ein Zusammenhang zwischen dem CRB3A-Expressionsmuster und dem Differenzierungsgrad der Tumoren an. Während gut und mäßig differenzierte Tumore häufiger, teilweise relativ starke, CRB3A-Immunfärbungen zeigten, nahm die Häufigkeit und Intensität der CRB3A-Immunfärbung in schlecht differenzierten Tumoren ab oder ging ganz verloren. Auffällig war, dass in mäßig und schlecht differenzierten Tumoren vermehrt Färbungen des Zytoplasmas und/oder der Vakuolen beobachtet wurden. Signifikante Korrelationen zu pathologischen Parametern konnten allerdings nicht festgestellt werden. Zusammenfassend belegen die gezeigten Ergebnisse, dass es während der Tumorprogression zu einer Relokalisation des CRB3A-Proteins von der Zelloberfläche in das Zytoplasma der Zellen kommen kann.

#### **4.8 CRB3A-Expression in verschiedenen humanen Normalgeweben**

Zur Ermittlung der CRB3A-Expression in humanen Normalgeweben wurde der AccuMax™ A103VI Gewebe-Array (ISU ABXIS, siehe 3.4.10), auf dem 45 Gewebetypen mit jeweils 2 Stanzen (1 mm Durchmesser) lokalisiert sind, mit dem aufgereinigten CRB3A-Antikörper immungefärbt. Tab. 4.6 zeigt die Ergebnisse mit Angabe der Intensität und zellulären Lokalisation der Immunreaktionen.

Bei den CRB3A-exprimierenden Geweben handelt es sich fast ausschließlich um Epithelien, wobei die CRB3A-Immunreaktion am häufigsten an der apikalen Membran, seltener dagegen im Zytoplasma von Epithelzellen zu beobachten war. Die stärkste membranständige CRB3A-Expression wurde in Drüsenzellen der Prostata, des Dünndarms und des Kolons detektiert. Eine starke zytoplasmatische Expression wurde beispielsweise auch in Langerhans'schen Inseln im Pankreas nachgewiesen. Endothelzellen zeigten keine oder nur in seltenen Fällen eine schwache zytoplasmatische CRB3A-Expression. In Makrophagen und Monozyten wurde hingegen eine starke zytoplasmatische CRB3A-Immunreaktion beobachtet.

Tab. 4.6: CRB3A-Expression in verschiedenen Normalgeweben

Gewebe	Zelltyp	Int.*	Lokal.**
Zunge	Plattenepithelzellen	0	-
Lunge	Alveoli	+	a
Ösophagus	Plattenepithelzellen	0	-
Parotis	Azini	++	a
		+	z
Magen	Zylinderepithel- & schleimsekretierende Zellen, Saumepithelzellen	+ +	a z
Dünndarm, Duodenum, Ileum, Kolon, Rektum	absorptive, Becher- und Kryptzellen, am stärksten Zellen des Blinddarms	+ /++/+++	a
Gallenblase	Zylinderepithelzellen	+	a
Leber	Hepatozyten	+	a
	Kupferzellen	++/+++	z
Pankreas	Azini	++	a,z
	Zentroazinäre Zellen	++	a,z
	Zylinderepithelzellen, duktales Zellen	++	a,z
	Langerhans'sche Inseln	+++	z
Mamma, Drüsen	Luminale Zellen	+	a
Niere, Kortex	Tubuläre Zellen, proximal	+	z
	Tubuläre Zellen, distal	+	a
	Glomeruli	+++	z
Niere, Medulla	Tubuläre Zellen, distal	++	z
Uterus, Ektoservix	Basale and parabasale Zellen	0	-
Uterus, Endometrium			
- proliferativ	Drüsenzellen	++	a
- sekretorisch	Drüsenzellen	+	a
Eileiter	Ziliäre und sekretorische Zellen	+++	a
Ovar	Stromazellen	0	-
Plazenta	Amnion und Chorionvilli	0	-
	Chorionepithel	+	z
Prostata	Zylinderepithel-, sekretorische Zellen	+++	a,z
Testis	Spermatogonium, prim., sek. Spermatozyten	0	-
Haut, oberste Schicht	Basalzellen	0/+	z
	parabasale, intermediäre, superfizielle Zellen	0	-
Schilddrüse	Follikuläre Epithelzellen	+	a,z
Nebenniere	Kortikale Zellen	+ /++/+++	z
Lymphknoten, Thymus	Lymphoblasten, -zyten	0	-
	Mastzellen, Monozyten	+++	z
Zerebraler Kortex	Astrozyten, Neurone, Endothelzellen	+	z
	Oligodendrozyten	0	-
Zerebellum	Purkinje Zellen	0	-
	Endothelzellen	+	z
Hippocampus	Astrozyten	+	z
	Oligodendrozyten, Neurone	0	-
Herz	Myozyten	+	z
Skelettmuskulatur	k.A.	0	-

\*: Intensität und \*\*: zelluläre Lokalisation der Immunfärbung; +: schwache, ++: mäßige, +++: starke CRB3A-Expression

Die bisherigen Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass das CRB3A-Protein in einer Vielzahl adulter, vorwiegend epithelialer, Gewebe exprimiert wird. Die Tatsache, dass das Protein in einigen Epithelzellen intrazellulär lokalisiert ist, deutet darauf hin, dass die CRB3A-Funktion mit der Lokalisation des Proteins assoziiert ist. Aufgrund der geringen Größe der Gewebeproben sowie der limitierten Anzahl an Stenzen lassen sich jedoch keine weiteren allgemeingültigen Aussagen zum jeweiligen Gewebetyp treffen.

#### **4.9 CRB3A-Expression in verschiedenen humanen Tumoren**

Zur Untersuchung der CRB3A-Proteinexpression in verschiedenen Tumortypen wurde der AccuMax<sup>TM</sup> A301 V Gewebearray (ISU ABXIS; siehe 3.4.10) verwendet. Auf diesem TMA waren jeweils 2 Stenzen (1 mm Durchmesser) von 30 verschiedenen Tumorgeweben und zusätzlich jeweils 1 Stanze des korrespondierenden Normalgewebes, das angrenzend an den Tumor resektiert wurde, lokalisiert. Die Immunfärbung wurde mit dem aufgereinigten CRB3A-spezifischen Antikörper vorgenommen.

Aus den in Tab. 4.7 zusammengefassten Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Expression des CRB3A-Proteins in vielen verschiedenen und vorwiegend epithelialen Tumoren im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe schwächer ist oder vollständig verloren ging. Zum Beispiel weisen Nierenzellen zytoplasmatisch lokalisiertes CRB3A-Protein auf, während CRB3A im Tumor nicht nachzuweisen ist. Interessanterweise stellt das Prostata-Gewebe eine Ausnahme dar, da sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe eine starke membranständige und zytoplasmatische CRB3A-Expression zu beobachten war. Folgende Gewebe exprimierten das CRB3A-Protein weder im Tumor- noch im Normalgewebe: Gehirn, Ösophagus, Hypopharynx, Weichteile, Haut, Zunge, Lunge, Ovar, Zervix, Testis und Thymus.

Tab. 4.7: CRB3A-Expression in Tumor- und Normalgeweben

Organ	Normalgewebe			Tumorgewebe		
	Zelltyp	Int.*	Lokal.**	Tumortyp	Int.*	Lokal.**
Gehirn	Astrozyten	0	-	Glioblastom	0	-
Ösophagus	Plattenepithelzellen	0	-	Plattenepithelkarzinom	0	-
Larynx	k.A.	-	-	Plattenepithelkarzinom	+	z
Hypopharynx	Plattenepithelzellen	0	-	Plattenepithelkarzinom	0	-
Leber	Hepatozyten	++	z	Hepatozelluläres Karzinom	+	z
Schilddrüse	Strumazellen	++	a	Papilläres Karzinom	0	-
Weichteile	Muskelzellen	0	-	Großzelliges Lymphom	0	-
Haut	Plattenepithelzellen	0	-	Plattenepithelkarzinom	0	-
Zunge	Plattenepithelzellen	0	-	Plattenepithelkarzinom	0	-
Lunge	k.A.	0	-	Plattenepithelkarzinom	0	-
Lunge	k.A.	0	-	Adenokarzinom	0	-
Pankreas	Azini	+++	a	Adenokarzinom	+	a
Pankreas	Azini	+++	a	Adenokarzinom	++	a
		+	z			
Kolon	Kryptzellen	+	a	Adenokarzinom	++	a
					+	z
Magen	Drüsenzellen	+	a	Adenokarzinom	+	a
Magen	Drüsenzellen	++	z	Siegelringzellkarzinom	0	-
Niere	Tubuläre Zellen	++	z	Nierenzellkarzinom	0	-
	Glomeruläre Zellen	++	z			
Niere	Tubuläre Zellen	++	z	Nierenzellkarzinom	0	-
	Glomeruläre Zellen	++	z			
Parotis	Azini	+	a	Plattenepithelkarzinom	0	-
	Intermediärzellen	++	z			
Ovar	k.A.	0	-	Dottersacktumor	0	-
Ovar	k.A.	0	-	Endodermaler Sinustumor	0	-
Uterus	Plattenepithelzellen	0	-	Adenokarzinom	++	a
Zervix	Plattenepithelzellen	0	-	Plattenepithelkarzinom	0	-
Brust	Lobuloalveoläre Einheiten, luminale Zellen	+	a	duktales Adenokarzinom	+	z
Brust	Lobuloalveoli, luminale Zellen	+	a	duktales Adenokarzinom	0	-
Prostata	Drüsenzellen (Hyperplasie)	+++	a	Adenokarzinom	+++	a
		+++	z		+	z
Prostata	k.A.	-	-	Adenokarzinom	+ / +++ / +++	z
					++	a
Testis	Seminiferöse Tubuli, Spermatozoen, prim., sek. Spermatozoen	0	-	Seminom	0	-
Thymus	k.A.	-	-	Thymom	0	-

\*: Intensität der Färbung; +: schwache, ++: mäßige, +++: starke Färbeintensität

\*\* : zelluläre Lokalisation der Färbung

In Abb. 4.30 sind exemplarisch mikroskopische Aufnahmen der CRB3-Immunfärbungen an Normal- und Tumorgeweben aus Kolon, Niere, Pankreas, Leber und Prostata dargestellt. Am Beispiel des Kolonkarzinoms (Abb. 4.30) ist besonders gut zu erkennen, dass die apikale Expression des CRB3A-Proteins in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Tumorzellen verloren geht und das Protein im Zytoplasma der Zellen akkumuliert. Um jedoch allgemeingültigere Aussagen über die Rolle des CRB3A-Proteins in der Karzinogenese treffen zu können, sind umfangreichere Untersuchungen zu den einzelnen Tumorentitäten unabdingbar.

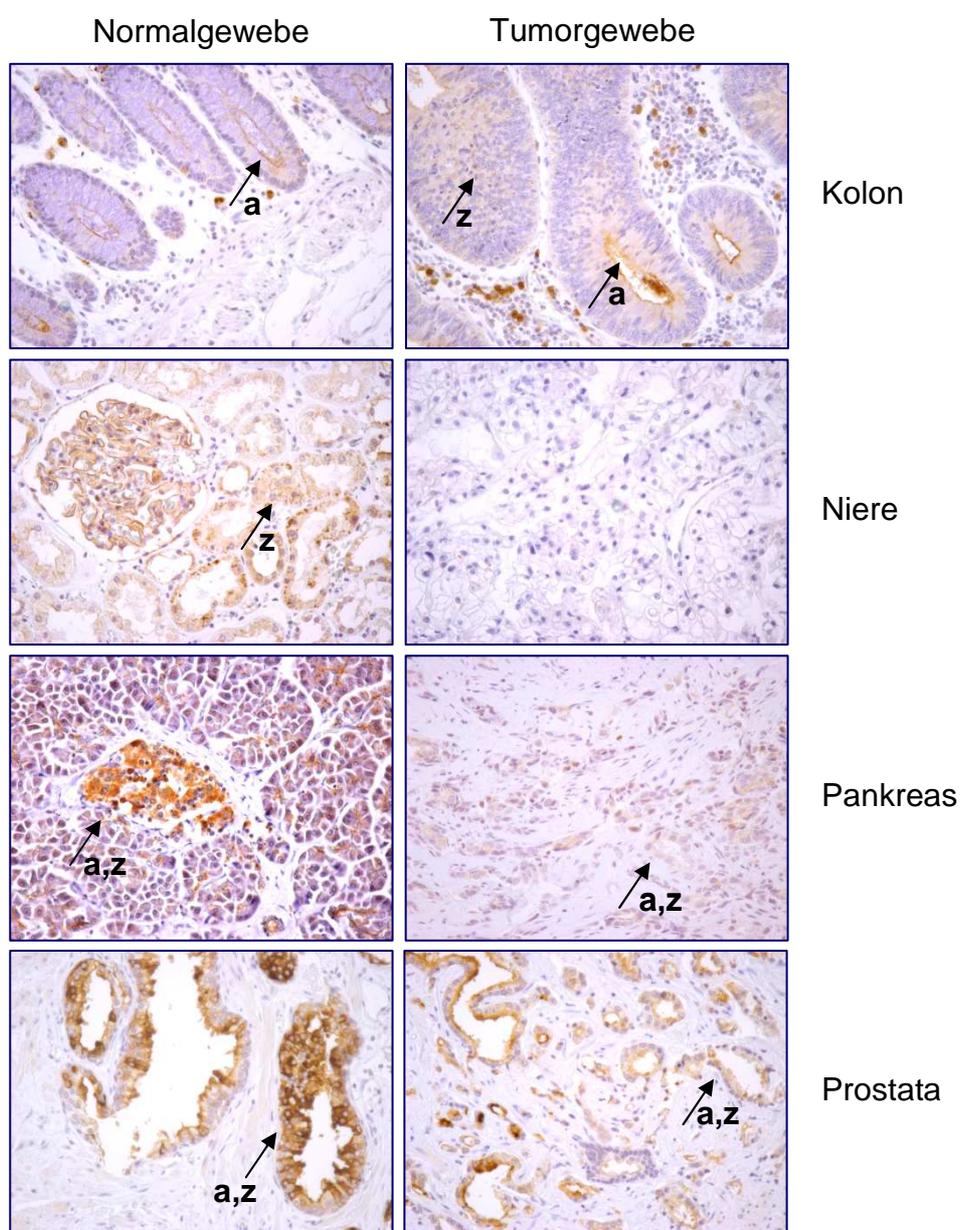


Abb. 4.30: Immunhistologische Färbungen zur Analyse der CRB3A-Expression in Normal- und Tumorgeweben aus Kolon, Niere, Pankreas und Prostata. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung. Pfeile indizieren eine positive CRB3A-Immunreaktion; a: apikale, z: zytoplasmatische CRB3A-Expression.

## 5 Diskussion

Ergebnisse einer neu entwickelten Methode zur Identifizierung Brustkrebs-assoziiierter Gene lieferten die Grundlage für die vorliegende Arbeit. Ausgehend vom Transkriptom der humanen Mammakarzinom-Zelllinie GI-101 wurde eine retrovirale cDNA-Expressionsbibliothek generiert und NIH3T3-Zielzellen damit transduziert. Ein aufwendiges Selektionsverfahren diente der Identifizierung von cDNAs, deren stabile genomische Integration und Expression zur Transformation der NIH3T3-Zellen führte. Im Zuge dieser Analysen wurde unter anderem CRB3 als potenzielles Proto-Onkogen identifiziert. Ein Ziel der hier vorliegenden Studien war es deshalb, die möglichen onkogenen Eigenschaften des CRB3-Gens genauer zu charakterisieren und molekulare Zusammenhänge der CRB3-vermittelten malignen Entartung von Zellen aufzuklären. Des Weiteren sollte die Bedeutung der CRB3-vermittelten Transformation von Zellen für das humane Mammakarzinom untersucht werden.

### 5.1 Transformierende Eigenschaften des CRB3-Gens

Die Identifizierung von CRB3 als potentielles Proto-Onkogen basiert auf einer phänotypischen Selektion von cDNAs mit transformierenden Eigenschaften, deren Integration in das Genom von NIH3T3-Zellen zur Aufhebung des kontaktinhibierten Wachstums führten. Ob CRB3 tatsächlich als neues Proto-Onkogen klassifiziert werden kann, sollte mit Hilfe weiterer Transformationsassays geklärt werden. Überraschenderweise stellte sich im Zuge erster Untersuchungen heraus, dass von der in das NIH3T3-Genom integrierten CRB3 cDNA zwei Transkriptvarianten gebildet werden, wodurch es zur Expression von zwei unterschiedlichen Isoformen des CRB3-Proteins in den Zellen kommt. Um aufzuklären, welches der beiden Genprodukte ein onkogenes Potential besitzt, wurden NIH3T3-Zellen stabil mit Expressionsplasmiden transfiziert, die jeweils für CRB3A oder CRB3B, nicht aber für CRB3A und CRB3B kodierten. Die Ergebnisse der durchgeführten Transformationsassays belegen eindeutig, dass nur ein CRB3-Genprodukt, und zwar CRB3A, onkogene Eigenschaften besitzt. Die stabile Überexpression von CRB3A in NIH3T3-Zellen induzierte Veränderungen der Zellmorphologie, steigerte die Zellteilungsaktivität, bewirkte ein Substrat-unabhängiges Wachstum und die Ausbildung von Tumoren in Nacktmäusen. Dabei fielen die von CRB3A induzierten

Effekte im Vergleich zu dem als Positivkontrolle mitgeführten Onkogen RAF1 in allen Transformationsassays auffallend stark aus. Die beobachtete CRB3B-induzierte Steigerung der Zellteilungsaktivität ist eventuell auf eine kürzlich beschriebene Funktion des Proteins in Zellteilungsprozesse zurückzuführen [88]. Ein onkogenes Potential konnte für die CRB3B-Isoform nicht festgestellt werden. An dieser Stelle sei erwähnt, dass weitere Fragen und Aspekte bezüglich der CRB3B-Expression in Kapitel 5.5 ausführlich diskutiert werden. Zusammenfassend konnte CRB3A eindeutig als neues Proto-Onkogen klassifiziert werden. Um die Mechanismen der CRB3A-vermittelten Transformation von Zellen zu verstehen, wurden umfangreiche funktionelle Studien angestellt.

## **5.2 Mechanismen der CRB3A-induzierten Transformation in NIH3T3-Zellen**

### ***Die intrazelluläre Lokalisation des CRB3A-Proteins***

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation des CRB3A-Proteins ergab, dass die maligne Transformation von NIH3T3-Zellen durch intrazellulär exprimiertes CRB3A vermittelt wird. Prinzipiell lässt sich nicht auszuschließen, dass dies eine Folge der Überexpression ist, die zur Überlastung des zellulären Sortierapparates und somit zur Akkumulation des CRB3A-Proteins im Zytoplasma der NIH3T3-Zellen führt. Immunhistochemische Analysen an humanen Geweben lieferten jedoch zusätzliche Hinweise darauf, dass eine geänderte subzelluläre Sortierung des Proteins auch in Mammakarzinom-Zellen stattfindet. Wodurch die intrazelluläre Lokalisation des Proteins determiniert wird, ist allerdings noch unklar. An humanen Intestinalzellen konnte gezeigt werden, dass ein *knockdown* von PATJ die Interaktion von PALS1 und CRB3 verhinderte, was zur Akkumulation des CRB3-Proteins in Endosomen-ähnlichen Kompartimenten führte [53]. Des Weiteren berichten zwei Studien an *Drosophila* Follikelzellen über eine Dynein-vermittelte apikale Lokalisierung der Stardust (Sdt) und Crumbs-mRNA-Transkripte und Proteine [95, 96]. Defekte in der Dynein-Funktion verursachten hauptsächlich Störungen in der apikalen Sortierung des Crb-Proteins, gleichzeitig wurde eine zytoplasmatische Expression der Sdt- und Patj/Dlt-Proteine beobachtet. Auswirkungen auf die Sortierung des Par-Komplexes und anderer Polaritätsmarker wurden hingegen nicht festgestellt. Im 3'UTR des Crumbs-Transkripts

konnte ein Sequenzbereich identifiziert werden, der essenziell ist für die Wechselwirkung mit dem Sdt-Protein und dem Dynein-getriebenen Proteintransport [96]. Ebenfalls an *Drosophila*-Embryonen wurde ein Phosphorylierungs-abhängiger Sortierungsmechanismus untersucht [90]. Hierbei wurde gezeigt, dass die aPKC-vermittelte Phosphorylierung einen regulatorischen Einfluss auf die apikale Lokalisation des Crumbs-Proteins hat. Embryonen, die eine nicht-phosphorylierbare Crumbs-Mutante exprimierten, zeigten statt der membranständigen eine diffus zytoplasmatische Lokalisation des Proteins in Epithelzellen. Auch die aPKC- und PATJ-Proteine waren diffus zytoplasmatisch statt apikal sortiert, der basolaterale Marker Scribble wurde hingegen an der apikalen Membran detektiert. Zusätzlich traten nach Expression des nicht-phosphorylierbaren Crumbs-Proteins in den Imaginalscheiben der Embryonen Defekte im Aufbau des Flügelepitheliums auf. Weder Expressionsanalysen an NIH3T3-Fibroblasten noch an Mammakarzinom-Zellen gaben Aufschluss über den Phosphorylierungszustand des CRB3A-Proteins. So wurde beispielsweise die Möglichkeit einer Relokalisation von CRB3A durch eine Co-Expression mit verschiedenen aPKC-Isoformen und konstitutiv-aktiven aPKC-Mutanten an der MCF-7 TetOn/CRB3A-Zelllinie genauer untersucht. Eindeutige Effekte auf die zytoplasmatische CRB3A-Expression konnten mittels immunzytochemischer Analysen allerdings nicht festgestellt werden (nicht gezeigte Daten). Es bedarf weiterer Untersuchungen um aufzudecken, welche Sortierungs- und Transportmechanismen die subzelluläre CRB3A-Lokalisation determinieren.

### ***Das ERLI-Motiv in CRB3A ist essenziell für die Induktion der Transformation***

Weitere Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge der CRB3A-induzierten Transformation sollten Mutationsstudien und Bindungsassays liefern. Die Mutationsstudien dienen dabei in erster Linie der Identifizierung von CRB3A-Proteindomänen, welche für die Vermittlung der onkogenen Eigenschaften essenziell sind. Das transformierende Potential verschiedener CRB3-Mutanten wurde im Fokus-Assay analysiert. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass die CRB3A-induzierte Transformation von NIH3T3-Fibroblasten abhängig ist von der PDZ-Protein-Bindungsdomäne am C-Terminus des Proteins. Allein die Deletion des hochkonservierten ERLI-Motivs verhinderte schon eine Transformation der Zellen. In Epithelzellen wird der ERLI-Sequenz eine wichtige Rolle für die Funktion des

CRB3A-Proteins zugeschrieben, da sie als Bindungsdomäne für die beiden PDZ-Proteine PALS1 und Par6 fungiert [71, 86, 87], was wiederum für die Ausbildung der apikalen Zellpolaritätskomplexe von Bedeutung ist.

### ***Die Identifikation von Par6 als CRB3A-Interaktionspartner***

Eine ERL1-abhängige Interaktion zwischen CRB3A und dem Par6-Protein in NIH3T3-Zellen konnte mit Hilfe von Co-Immünpräzipitationen nachgewiesen werden. Anhand der Western Blot Analysen konnte allerdings nicht eindeutig geklärt werden, um welchen Vertreter der Par6-Proteine es sich hierbei handelt, da der verwendete Antikörper sowohl das Par6a-, Par6b- als auch das Par6g-Protein erkennt. Einzig Par6g konnte aufgrund eines abweichenden Molekulargewichts ausgeschlossen werden. Sowohl Genexpressionsanalysen als auch PCR-Analysen (nicht gezeigte Daten) an NIH3T3-Zellen deuten jedoch darauf hin, dass es sich bei dem hier identifizierten Bindungspartner um Par6b handelt. Überraschenderweise konnte keine Interaktion zwischen CRB3A und dem PALS1-Protein in NIH3T3/CRB3A-Zellen nachgewiesen werden. Sowohl Arbeiten an *Drosophila*, als auch an MDCK-Zellen beschreiben Störungen beim Aufbau der epithelialen Zellpolarität und Zell-Zell-Kontakte nach Verlust der PALS1-CRB3-Wechselwirkung [48, 49, 51, 86]. CRB3A, PALS1 und Par6 bilden in Epithelzellen einen ternären Proteinkomplex aus [70, 71, 86]. Dabei konkurrieren PALS1 und Par6 um eine PDZ-Bindedomäne in CRB3A, gleichzeitig konkurrieren CRB3A und PALS1 um eine Bindestelle in Par6 [97]. Möglicherweise wird das Bindungsgleichgewicht in Folge der CRB3A-Überexpression zugunsten der CRB3A-Par6-Interaktion verschoben, sodass es zur Verdrängung des PALS1-Proteins aus diesem Komplex kommt. Dies könnte auch im Zusammenhang mit der zytosplasmatischen Lokalisation des CRB3-Proteins stehen, denn Studien an *D. melanogaster* und humanen Epithelzellen belegten, dass die Bindung von CRB3 (Crumbs) an PALS1 (Stardust) wichtig ist für die korrekte Sortierung des Proteins [49, 51]. Dieser Sachverhalt ließe sich beispielsweise durch eine Überexpression des PALS1-Proteins in NIH3T3/CRB3A-Zellen überprüfen.

### ***Die Aktivierung der kleinen RhoGTPasen Cdc42 und Rac1/2/3***

Der Nachweis der CRB3A-Par6-Interaktion war von großer Bedeutung für nachfolgende Arbeiten. Auf Basis mehrerer Studien zum transformierenden Potenzial

des Par6-Proteins wurde eine Arbeitshypothese zur CRB3A-induzierten Signalkaskade entwickelt. Es ist bekannt, dass die Par6-vermittelte Transformation von NIH3T3-Zellen abhängig ist von der Bindung GTP-beladener, also aktiver Cdc42- und Rac1/2/3-Moleküle an das Par6-Protein [98]. Dass eine Expression von Par6 mit konstitutiv aktiven Cdc42- und Rac1/2/3-Mutanten eine synergistische Wirkung hat, wurde von Noda et al. gezeigt [63]. In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass die Bindung der neuronalen Proteine Rin und Rit an die PDZ-Domäne in Par6 zur Rekrutierung GTP-gebundener Cdc42- und Rac1/2/3-Moleküle an die CRIB-Domäne des Par6-Proteins führt, was wiederum zur zellulären Transformation beiträgt [91]. Damit stellte sich die Frage, ob eine Aktivierung dieses Signalwegs auch durch die Bindung anderer Proteine, wie z.B. CRB3A, an die PDZ-Domäne von Par6 erfolgen könnte. Um zu überprüfen ob es in Folge der CRB3A-Par6-Interaktion zur Rekrutierung aktivierter Cdc42 und Rac1/2/3-Proteine kommt, wurden GTPase Aktivierungsassays durchgeführt. In der Tat konnte eine gesteigerte Cdc42- und Rac1/2/3-Aktivierung in CRB3A-exprimierenden NIH3T3-Zellen, nicht aber in Zellen, die eine CRB3A- $\Delta$ ERLI-Deletionsmutante exprimierten, nachgewiesen werden. Die kleinen Rho-GTPasen fungieren als molekulare Schalter, die eine Vielzahl von Prozessen, z.B. die Modellierung des Aktin-Zytoskeletts oder die Ausbildung der Zellteilungsfurche, regulieren und somit zur zellulären Transformation beitragen [99].

### ***Die Aktivierung der CRB3A-Signalkaskade induziert starke Veränderungen im Genexpressionsprofil***

Da die Transformation von Zellen eine drastische Veränderung darstellt, wurde erwartungsgemäß eine hohe Anzahl deregulierter Gene in CRB3A-exprimierenden NIH3T3-Zellen identifiziert. Ganz offensichtlich kommt es in Folge der CRB3A-Par6-Interaktion zur (De-)Regulation zahlreicher Signalkaskaden, was im Einklang mit den von Qiu et al. beschriebenen Effekten der Par6-induzierten Transformation steht [98]. Vom Par6-Protein rekrutierte Cdc42 und Rac1/2/3-Moleküle induzieren unter anderem die Transkription von Cyclin D1, was letztendlich zur Inaktivierung des Tumorsuppressor-Proteins Rb führt [100]. Zusätzlich sind die kleinen GTPasen in der Lage den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B zu aktivieren, der seinerseits eine Steigerung der Zellteilungsrate vermittelt und gleichzeitig die Apoptose inhibiert, was zur zellulären Transformation von Zellen beiträgt [101].

Eine ausführliche Analyse der Genexpressions-Daten konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen werden, aber bereits die ersten Auswertungen lieferten interessante Hinweise. So sind beispielsweise unter den 10 am stärksten hochregulierten Genen drei Vertreter der Matrixmetalloproteasen zu finden (siehe 4.3, Tab. 4.4). Diesen Proteinen wird bei der Progression von Tumoren eine metastasierungsfördernde Funktion zugeschrieben, da sie am Abbau der Extrazellulären Matrix beteiligt sind und somit die Migration und Invasion von Tumorzellen in das umliegende Stroma begünstigen [102]. Die Analyse gemeinsam regulierter Gengruppen (Gen-Ontologien, GO) ergab, dass unter anderem Gene, die eine Rolle im Lipidstoffwechsel von Zellen spielen, dereguliert sind. Dies lässt Spekulationen über eine Verwicklung des ursprünglich membranständigen CRB3A-Proteins in intrazelluläre Sortierungsprozesse zu, denkbar wäre auch eine Funktion bei Exozytose- oder Endozytose-Prozessen. Für das in den *Drosophila*-Rhabdomeren exprimierte Crumbs-Protein und auch für das humane CRB1-Protein wird im Zusammenhang mit einer lichtinduzierten Degeneration der Photorezeptoren über eine Beteiligung der Proteine an Transportprozessen von und zur Zellmembran spekuliert (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Elisabeth Knust). Auch für andere Zellpolaritätsproteine, wie beispielsweise DLG und LGL, wurde eine Funktion im Proteintransport und eine Verknüpfung mit der Exozytose-Maschinerie in MDCK-Zellen bereits beschrieben [67].

Mit Hilfe der durchgeführten Mutationsanalysen und Bindungsassays war es möglich die ersten Stufen der CRB3A-Signalkaskade der zellulären Transformation von NIH3T3-Fibroblasten aufzuschlüsseln. Zytoplasmatisch exprimiertes CRB3A bildet einen ternären Proteinkomplex mit Par6 und Cdc42/Rac1/2/3 aus, wodurch es zur Aktivierung multipler Signalwege in den Zellen kommt. Zusammengefasst sind die hier gezeigten Resultate mit Bezug auf bisher publizierte Arbeiten über die Funktion und das Zusammenwirken von CRB3, Par6 und Cdc42/Rac durchaus schlüssig.

## **5.3 Expressionsstudien an humanen Mammakarzinom-Zelllinien**

### **5.3.1 Die CRB3-Expression in Mammakarzinom-Zellen**

Mit der Herstellung spezifischer, polyklonaler Antikörpern gegen die CRB3A- und CRB3B-Isoformen wurden essenzielle Werkzeuge für Analysen zur CRB3-

Expression generiert. Erkenntnisse über die Rolle des CRB3-Gens in der Karzinogenese sollten durch Expressionsstudien an humanen Mammakarzinom-Zelllinien, aber auch an normalen und malignen Geweben gewonnen werden. Zunächst wurde die Expression der CRB3-Isoformen auf Transkript- und Proteinebene an zehn Mammakarzinom-Zelllinien untersucht. Dabei wurde für das CRB3A-Transkript eine relativ gleichmäßige und für das CRB3B-Transkript eine differentielle Expression in acht der zehn untersuchten Zelllinien festgestellt. Überraschenderweise korrelierten die Expressionsmuster beider CRB3-Proteine aber nicht mit denen der Transkripte, was auf eine posttranslationale Regulation der Proteinexpression hindeutet. Das CRB3A-Protein wird in den Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert, das CRB3B-Protein konnte sogar nur in einer Zelllinie (ZR-75-1) nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass für den Nachweis des CRB3B-Proteins die Methode der Proteinextraktion (SDS-Lysispuffer) eine entscheidende Rolle spielte. Bei den zwei Zelllinien, die keine Expression der beiden CRB3-Transkriptvarianten aufweisen, handelt es sich um MDA-MB-231 und MDA-MB-453s-Zellen. Diese Zelllinien besitzen einen ausgeprägten mesenchymalen Phänotyp, der mit einer geringen Differenzierung und einer hohen Tumorigenität der Zellen assoziiert ist [103]. In diesem Zusammenhang wird in der Literatur durchaus kontrovers diskutiert, ob diese Zelllinien tatsächlich als Modellsysteme für repräsentative Studien zur Progression des humanen Mammakarzinoms geeignet sind [104].

Über die Regulation der CRB3-Expression ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur sehr wenig bekannt. Die EMT-Transkriptionsfaktoren Snail und ZEB-1 wurden als Repressoren der CRB3-Expression in MDCK- bzw. MDA-MB-231-Zellen identifiziert [39, 40]. Dass diese von Aigner et al. beschriebene Funktion von ZEB-1 nicht für alle Mammakarzinom-Zelllinien zutrifft, belegen die hier durchgeführten Expressionsstudien allerdings eindeutig. Eine inverse Korrelation im Expressionsmuster von ZEB-1 und CRB3 konnte zwar für MDA-MB-231-Zellen bestätigt werden, die in anderen Zelllinien nachgewiesene Co-Expression beider Proteine steht jedoch im Widerspruch zur Funktion von ZEB-1 als Repressor der CRB3-Expression. Und die Tatsache, dass die meisten Mammakarzinom-Zelllinien eine relativ stabile Expression des CRB3A-Transkripts und -Proteins aufweisen, deutete eher darauf hin, dass es zu einer Relokalisation und weniger zu einer transkriptionellen Herunterregulation von CRB3 in Mammakarzinom-Zellen kommt.

### 5.3.2 Untersuchung CRB3A-induzierter Signalwege in Mammakarzinom-Zellen

Dass die Funktionen des CRBA-Proteins in Epithelzellen eng mit einer membranständigen Expression assoziiert sind, wurde eingehend beschrieben. Im Zusammenhang mit einer Fehllokalisierung des Crb-Proteins beobachtete Missbildungen in embryonalen Drosophila-Epithelien [65, 90] aber auch die Ergebnisse eigener immunhistologische Studien lieferten ernstzunehmende Hinweise darauf, dass eine geänderte subzelluläre CRB3A-Expression in Tumorzellen vorliegen könnte. Die Ergebnisse der immunzytochemischen Detektion des CRB3A-Proteins in T47D-Zellen bestätigten, dass es zu einer Translokation des Proteins in das Zytoplasma von Mammakarzinom-Zellen kommt.

#### ***Die Etablierung eines Modellsystems für funktionelle Studien***

Für die Durchführung funktioneller Studien zur Aufdeckung des CRB3A-Signalwegs in Mammakarzinom-Zellen war die Etablierung eines Modellsystems nötig. Zur Entwicklung einer geeigneten Strategie wurden mehrere Optionen gegeneinander abgewogen. Dabei stellte sich heraus, dass ein siRNA-vermittelter *knockdown* der CRB3A-Isoform aufgrund der eingeschränkten Auswahl transkriptspezifischer Zielsequenzen praktisch unmöglich ist. Durch eine starke Überexpression des Proteins läuft man wiederum Gefahr Zellkultur-Artefakte zu generieren. Als Lösungsansatz für Gendosis-abhängige Analysen bot sich die Etablierung eines Tetrazyklin-induzierbaren (TetOn)-Expressionssystems an. Aufgrund der schwachen endogenen CRB3A-Proteinexpression war die MCF-7-Zelllinie für Studien CRB3A-induzierter Effekte besonders gut geeignet. Zur Herstellung des Modellsystems wurde die MCF-7 TetOn-Zelllinie (Clontech) verwendet und stabil mit einem Doxyzyklin-induzierbaren Expressionsplasmid, das für FLAG-getaggtetes CRB3A-Protein kodierte, transfiziert. Die erfolgreiche Etablierung dieses MCF-7 TetOn/CRB3A-Expressionssystems ermöglichte die Durchführung weiterer Studien zur Funktion des CRB3A-Proteins in Mammakarzinom-Zellen.

In Anlehnung an zuvor durchgeführte Analysen an NIH3T3/CRB3A- und T47D-Zellen wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation des transient überexprimierten CRB3A-Proteins in MCF-7 TetOn/CRB3A-Zellen untersucht. In dieser Zelllinie wurde ebenfalls ausschließlich eine zytoplasmatische Expression des CRB3A-

Proteins nachgewiesen. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass die CRB3A-induzierten Signalwege der onkogenen Transformation auch in humanen Mammakarzinom-Zelllinien wirksam sein könnten.

### ***Der CRB3A-Par6-Signalweg***

Mit Hilfe von Bindungsstudien konnte nachgewiesen werden, dass die in NIH3T3/CRB3A-Zellen identifizierte CRB3A-Signalkaskade auch in MCF-7-Zellen induziert wird. Durch Co-Immunpräzipitationen wurde das Par6-Protein, aber nicht PALS1 als CRB3A-Interaktionspartner in MCF-7 TetOn/CRB3A-Zellen identifiziert. Interessanterweise wurde für das Par6-Protein neben seiner Funktion in der Etablierung der Zellpolarität kürzlich auch eine Funktion als Aktivator der Proliferation in Brustepithelzellen beschrieben [105]. Die Tatsache, dass die Co-Präzipitation des Par6-Proteins in Abhängigkeit von der CRB3A-Expression erfolgte, ließ wiederum die Vermutung zu, dass es in Folge dieser Protein-Wechselwirkung zur Rekrutierung von aktivierten Cdc42- und Rac1/2/3-Molekülen kommt. Die Ergebnisse der anschließend durchgeführten GTPase Aktivierungsassays bestätigten diese Annahme. Dabei wurden leichte Unterschiede im Aktivierungsmuster von Cdc42 und Rac1/2/3 festgestellt. Für Cdc42 konnte eindeutig eine dosis-abhängige CRB3A-induzierte Aktivierung nachgewiesen werden. Auch für Rac1/2/3 war eine Aktivitätssteigerung zu verzeichnen, allerdings war die Korrelation mit der CRB3A-Expressionsstärke schwächer ausgeprägt als bei Cdc42. Möglicherweise ist die Menge an aktivierbaren Rac1/2/3-Molekülen im Vergleich zur Cdc42 insgesamt kleiner und eine maximale Aktivierung dadurch schneller erreicht. Zudem erfüllen die beiden GTPasen in Mammakarzinom-Zellen verschiedene Funktionen, Unterschiede im Aktivierungsmuster könnten durchaus die physiologischen Gegebenheiten in den Zellen widerspiegeln. Die Bedeutung der RhoGTPase-Signalwege für die Progression des humanen Mammakarzinoms aber auch anderer Tumorentitäten, z.B. des Hepatozellulären Karzinoms, wird in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben. [106]. Speziell für MCF-7 Zellen wurden auch schon E-Cadherin oder IQGAP1 als Aktivatoren von Cdc42 und Rac1/2/3 beschrieben [107, 108]. Dabei wurden Hinweise für eine bidirektionale Interaktion zwischen der E-Cadherin-induzierten Zell-Zell-Adhäsion und den RhoGTPase-Signalwegen gefunden [29]. Die IQGAP1-vermittelte Aktivierung von Cdc42 und Rac1/2/3 führte beispielsweise zu einer gesteigerten Proliferation und

Tumorigenität der Zellen [30].

Zusammengefasst lieferten die Untersuchungen zur CRB3A-Expression und Funktion Hinweise darauf, dass die NIH3T3-Signalwege auch in Mammakarzinom-Zelllinien eine Rolle spielen. Zytoplasmatisch exprimiertes CRB3A-Protein trägt im Zusammenspiel mit Par6 und Cdc42/Rac1/2/3 zur onkogenen Transformation von Tumorzellen bei und könnte somit eine wichtige Rolle in der Progression des humanen Mammakarzinoms spielen.

#### **5.4 Die Expression des CRB3A-Proteins in normalen und malignen Geweben**

Um Informationen über die physiologische Relevanz des CRB3A-Proteins im humanen Mammakarzinom zu erhalten, wurde die Expression des Proteins in Gewebeschnitten, die nach operativer Entfernung von Primärtumoren angefertigt wurden, untersucht. Im Normalgewebe der Mamma wird das CRB3A-Protein ausschließlich an der apikalen Membran epithelialer luminaler Zellen exprimiert, was mit seiner Funktion als apikal sortiertes Zellpolaritätsprotein einhergeht. Die Ergebnisse der Immunfärbungen deuten an, dass dieses Expressionsmuster in Mammakarzinomen möglicherweise in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Tumorzellen verloren geht. Bemerkenswert ist, dass neoplastische Zellen eine diffuse zytoplasmatische Färbung oder eine Akkumulation des CRB3A-Proteins in Vakuolen-ähnlichen Kompartimenten aufwiesen. Diese Beobachtungen unterstreichen die physiologische Relevanz der intrazellulären Lokalisation des Proteins in kultivierten Mammakarzinom-Zellen.

Ausgehend von diesen hochinteressanten Ergebnissen wurden die CRB3A-Expressionsanalysen auf andere normale und maligne Gewebe ausgeweitet. Hierfür wurden verschiedene Gewebearrays, auf denen Gewebestanden mit 1 mm Durchmesser aufgebracht waren, verwendet. Aufgrund der geringen Größe der Gewebeproben können sicher Tendenzen erkannt, aber keine allgemeingültigen Aussagen zum jeweiligen Gewebetyp gemacht werden. Eine CRB3A-Expression wurde überwiegend in epithelialen Geweben nachgewiesen. Interessanterweise zeigten die immunhistochemischen Färbungen, dass das CRB3A-Protein nicht nur in Tumoren sondern auch in einigen Normalgeweben zytoplasmatisch exprimiert wird, als Beispiele seien hier Leber (Kupferzellen), Pankreas (Langerhans'sche

Inseln) und Prostata (Zylinder-epithelzellen) genannt. Diese Befunde deuten auf eine bisher unbeschriebene Funktion des CRB3A-Proteins in der Wachstumskontrolle von Epithelzellen hin. Diesbezüglich wären Untersuchungen im normalen und malignen Prostatagewebe besonders reizvoll, da hier die mit Abstand stärkste CRB3A-Expression nachgewiesen wurde. Äußerst bemerkenswert ist zudem, dass ein verändertes CRB3A-Expressionsmuster auch in anderen Tumorentitäten festzustellen war. So zeigten Tumorzellen in Schilddrüse und Pankreas im Vergleich zum Normalgewebe eine schwächere apikale Expression und in Nierenzellen ging das zytoplasmatisch exprimierte Protein während der Karzinogenese vollständig verloren. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der durchgeführten immunhistologischen Studien sehr stark auf eine Beteiligung des CRB3A-Proteins in Schlüsselmechanismen der Karzinogenese hin.

## **5.5 Untersuchungen zur Expression und Funktion des CRB3B-Proteins**

Die Generierung von stabilen CRB3B-exprimierenden NIH3T3- bzw. MCF-7 TetOn-Zelllinien, aber auch Expressionsanalysen an Mammakarzinom-Zelllinien machten auf eine Diskrepanz bei der CRB3B-Transkript- und Proteinexpression aufmerksam. Während die Expression des Transgens in stabil transfizierten NIH3T3-Zellen durch die Inhibition der Proteindegradation eindeutig nachzuweisen war, blieben ähnliche Versuche mit stabil transfizierten MCF-7 TetOn/CRB3B-Zellklonen ohne Befund. Untersuchungen zur Stabilität des CRB3B-Proteins deuten auf eine Ubiquitin-vermittelte Proteindegradation hin. Transiente Transfektionsexperimente sprechen für eine Stabilisierung des CRB3B-Proteins durch die Mutation einer putativen Ubiquitylierungsstelle in der zytoplasmatischen Domäne des Proteins. Dass es sich hierbei um einen indirekten Effekt handelt, kann allerdings nicht restlos ausgeschlossen werden. Für eine Ubiquitin-vermittelte Degradation von CRB3B würde auch die kürzlich beschriebene Funktion des Proteins in der Regulation des Zellzyklus in MDCK-Zellen sprechen [109]. Fan et al. fanden heraus, dass CRB3B während der Zellteilung am Spindelapparat lokalisiert ist und hier mit dem Kerntransport-Faktor Importin- $\beta$  interagiert [88]. Eine Beteiligung von CRB3B an Prozessen der Zellteilung könnte den beobachteten proliferationsfördernden Effekt in NIH3T3-Zellen erklären. Interessanterweise beschreiben die

Autoren auch eine zellzyklusabhängige Expression der CRB3B-Isoform. Nachweislich exprimiert wird das Protein demnach während der Mitose in der Pro-, Meta- und Anaphase, nicht aber in der Telo- und Interphase. Wenn man bedenkt, dass sich ein Großteil der kultivierten Zellen in der Interphase befindet, ist es nicht verwunderlich, dass ein Nachweis der CRB3B-Proteinexpression in NIH3T3/CRB3B-Zellen und in verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien, mit Ausnahme von ZR-75-1, nicht möglich war. Insgesamt stehen die hier gemachten Befunde bezüglich der CRB3B-Expression im Einklang mit den publizierten Daten. Warum ausgerechnet ZR-75-1 Zellen eine CRB3B-Expression aufweisen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Denkbar wäre aber beispielsweise, dass eine Mutation vorliegt, die zur Stabilisierung des CRB3B-Proteins beiträgt oder aber die Abbaumechanismen in dieser Zelllinie grundsätzlich gestört sind.

## 5.6 Allgemeine Schlussfolgerungen

Aktuell ist relativ wenig darüber bekannt, welchen Beitrag die epithelialen Zellpolaritätsproteine zur Invasion und Migration von Tumoren leisten. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass die Polaritätsproteine sowohl als positive aber auch als negative Regulatoren an der Entwicklung invasiver Tumore beteiligt sind (zusammengefasst in [110]). Beispielsweise beschreiben einige Studien die verringerte Expression oder den kompletten Verlust von Scribble, DLG oder Lgl in Primärtumoren von Xerix-Karzinom-Patientinnen. [111, 112]. Interessanterweise wurde das E6-Onkoprotein der HPV16- und HPV18-Papilloma-Viren, die für die Entstehung von Xerix-Karzinomen verantwortlich sein können, als Vermittler der Scribble- und DLG-Degradation identifiziert [113]. Für aPKC-Proteine wurde eine deregulierte Expression in Lungenkarzinomen [114, 115] und auch in Mammakarzinom-Zellen nachgewiesen [116]. Darüber, dass nicht nur eine veränderte Expressionsstärke, sondern auch eine veränderte Lokalisation von Zellpolaritätsproteinen zur Tumورprogression beitragen könnte, wurde bisher nur spekuliert. Im Rahmen dieser Arbeit ist es nun erstmals gelungen, die Translokation des Transmembranproteins CRB3A in das Zytoplasma von Zellen mit der Entwicklung onkogener Eigenschaften in Verbindung zu setzen, was nachweislich eine Rolle bei der Transformation von Mammakarzinom-Zellen spielt.

Möglicherweise liefern die hier gemachten Beobachtungen auch Erklärungs-

ansätze für CRB3-vermittelte Effekte, die schon vor längerer Zeit beobachtet aber bisher nicht zufriedenstellend erklärt werden konnten. In Folge einer CRB3-Überexpression kommt es zur Aufweitung der apikalen Zellmembran und Störungen im Aufbau der *tight junctions* in MDCK-Zellen [86]. Es ist denkbar, dass das CRB3A-Protein in Folge der Überexpression auch in diesem Zelltyp nicht nur membranständig sondern zusätzlich zytoplasmatisch exprimiert wird und die damit einhergehenden transformierenden Eigenschaften antagonistisch auf die Entfaltung der membranassoziierten CRB3A-Funktion einwirken. Die induzierten Veränderungen der MDCK-Morphologie könnten rückblickend als Anzeichen einer CRB3A-vermittelten onkogenen Transformation der Epithelzellen gewertet werden.

Prinzipiell stellt die Translokierung von Oberflächenproteinen in das Zytoplasma oder den Zellkern einen weitverbreiteten Mechanismus zur Aktivierung zellulärer Signalkaskaden dar [117]. Im tumorrelevanten Kontext wurden ähnliche Phänomene beispielsweise auch für den Fas-Rezeptor in Ovarialkarzinom-Zellen [118] und den *Hepatocyte growth factor receptor* im Kolonkarzinom [119] beobachtet. In beiden Fällen ist davon auszugehen, dass die veränderte Lokalisation mit dem Verlust der ursprünglichen und möglicherweise mit dem Gewinn anderer Proteinfunktionen einher geht. Dass, wie hier für CRB3A demonstriert wurde, ein zytoplasmatisch exprimiertes Transmembranprotein ein onkogenes Potenzial besitzt, stellt (nach bestem Wissen) eine bisher unbeschriebene Ausnahme in der Progression des humanen Mammakarzinoms dar.

## 5.7 Ausblick

Um weiteren Aufschluss über die Funktion des Zellpolaritätsgens CRB3 in der malignen Transformation von Zellen, insbesondere im humanen Mammakarzinom, zu erhalten, sind vielfältige molekularbiologische Untersuchungen nötig.

Zur genaueren Charakterisierung der CRB3A-Par6-Signalkaskade bietet sich das generierte NIH3T3/CRB3A-Modellsystem an. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die CRB3A-induzierte Transformation der Zellen beispielsweise durch dominant-negative Mutanten des Par6-Interaktionspartners blockiert werden kann. Zudem könnten Endpunkte und Zielgene der CRB3A-Signalkaskade durch eine intensivere Auswertung der bereits vorgenommenen Mikroarray-Analyse von NIH3T3/CRB3A-Zellen ermittelt werden.

Eine wichtige Grundlage für weitere Untersuchungen der CRB3A-Funktion in Mammakarzinom-Zellen wurde durch die Generierung des MCF-7 TetOn-Modells geschaffen. Es würde sich anbieten, mögliche dosisabhängige Einflüsse der CRB3A-Expression auf das Migrations-, Invasions- oder Adhäsionsverhalten dieser Zellen zu analysieren. Weiterführend könnten die Tumorigenität und das metastatische Potenzial der Zellen in Tierexperimenten untersucht werden.

Nachdem ein Zusammenhang zwischen den onkogenen Eigenschaften und der zytoplasmatischen Lokalisation des CRB3A-Proteins entdeckt wurde, drängen sich Fragen zur Regulierung des intrazellulären Proteintransports auf. Der zu Grunde liegende Sortierungsmechanismus könnte durch den Einsatz spezifischer Organell-Marker aufgedeckt werden. Des Weiteren ist zu klären, ob die Funktion und Zusammensetzung der CRB3A-Signalkomplexe durch eine Phosphorylierung des Proteins reguliert wird. Und auch worauf die differentielle Expression des CRB3A-Proteins in Mammakarzinom-Zelllinien zurückzuführen ist, bleibt an dieser Stelle offen und ist untersuchenswert.

Die angestellten immunhistologischen Studien unterstrichen die physiologische Relevanz CRB3A-induzierter Signalwege im humanen Mammakarzinom, aber auch in anderen Tumorentitäten. Ausgehend von den hochinteressanten Ergebnissen der CRB3A-Expressionsanalysen in verschiedenen gesunden und malignen Geweben, wäre es besonders reizvoll die Funktion des CRB3A-Proteins in anderen Gewebetypen, wie z.B. Kolon, Pankreas oder Prostata zu untersuchen. Dies könnte weitere Erkenntnisse über die Beteiligung des CRB3A-Proteins bei zellulären Veränderungen während der Karzinogenese liefern.

Nicht zuletzt weil das CRB3B-Protein im Rahmen dieser Arbeit nur peripher untersucht wurde, sollte die Funktion dieses Proteins in humanen Mammakarzinom-Zellen weiter erforscht werden. Da einige aggressive Zelllinien eine starke Expression des CRB3B-Transkripts aufweisen, drängen sich durchaus Fragen zur Rolle dieses CRB3-Proteins in der Tumorprogression auf. Für entsprechende Analysen könnte eine Zellzyklus-Synchronisation der kultivierten Zelllinien, z.B. mit Nocodazol, hilfreich sein. Untersuchenswert ist auch inwiefern die Regulation der CRB3B-Proteinexpression in ZR-75-1 Zellen gestört ist. Hinweise zur physiologischen Relevanz von CRB3B in normalen und malignen Geweben könnten eventuell immunhistologische Studien liefern.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ferlay, J., et al., Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*, 2007. 18(3): p. 581-92.
2. Feinberg, B.A., *Breast Cancer Answers: Understanding and Fighting Breast Cancer*. Sudbury: Jones and Bartlett Publisher. 2005. 120.
3. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van't Veer, Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(8): p. 591-602.
4. Hellman, S.H., *Diseases of the breast*. Philadelphia: Lippicott William and Willkins, 2000: p. 407-423.
5. Sainsbury, J.R.C., T.J. Anderson, and D.A.L. Morgan, ABC of breast diseases: Breast cancer. *BMJ*, 2000. 321(7263): p. 745-750.
6. Ali, S. and R.C. Coombes, Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(2): p. 101-12.
7. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(6): p. 448-56.
8. Pantel, K., R.H. Brakenhoff, and B. Brandt, Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(5): p. 329-40.
9. Liotta, L.A., W.G. Stetler-Stevenson, and P.S. Steeg, Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest*, 1991. 9(5): p. 543-51.
10. Gonzalez-Mariscal, L., S. Lechuga, and E. Garay, Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog Histochem Cytochem*, 2007. 42(1): p. 1-57.
11. Martin, T.A. and W.G. Jiang, Tight junctions and their role in cancer metastasis. *Histol Histopathol*, 2001. 16(4): p. 1183-95.
12. Mori, M., et al., Role of tight junctions in the occurrence of cancer invasion and metastasis. *Med Electron Microsc*, 1999. 32(4): p. 193-198.
13. Behrens, J., Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor

- progression. *Cancer Metastasis Rev*, 1999. 18(1): p. 15-30.
14. Shin, K., V.C. Fogg, and B. Margolis, Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006. 22: p. 207-35.
  15. Greenburg, G. and E.D. Hay, Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*, 1982. 95(1): p. 333-9.
  16. Hay, E.D., An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*, 1995. 154(1): p. 8-20.
  17. Thompson, E.W., D.F. Newgreen, and D. Tarin, Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 5991-5; discussion 5995.
  18. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(2): p. 131-42.
  19. Christofori, G., New signals from the invasive front. *Nature*, 2006. 441(7092): p. 444-50.
  20. Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug, Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. 17(5): p. 548-58.
  21. Grunert, S., M. Jechlinger, and H. Beug, Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(8): p. 657-65.
  22. Thiery, J.P., Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(6): p. 442-54.
  23. Oda, H., S. Tsukita, and M. Takeichi, Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol*, 1998. 203(2): p. 435-50.
  24. Berx, G., et al., Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin Exp Metastasis*, 2007. 24(8): p. 587-97.
  25. Boyer, B., et al., Src and Ras are involved in separate pathways in epithelial cell scattering. *EMBO J*, 1997. 16(19): p. 5904-13.

26. De Craene, B., et al., The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 6237-44.
27. Moody, S.E., et al., The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell*, 2005. 8(3): p. 197-209.
28. Mani, S.A., et al., Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(24): p. 10069-74.
29. Huber, M.A., et al., NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*, 2004. 114(4): p. 569-81.
30. Ikenouchi, J., et al., Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 10): p. 1959-67.
31. Ohkubo, T. and M. Ozawa, The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 9): p. 1675-85.
32. Vandewalle, C., et al., SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(20): p. 6566-78.
33. Martinez-Estrada, O.M., et al., The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J*, 2006. 394(Pt 2): p. 449-57.
34. Moreno-Bueno, G., et al., Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 2006. 66(19): p. 9543-56.
35. Peinado, H. and A. Cano, A hypoxic twist in metastasis. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(3): p. 253-4.
36. Barrios-Rodiles, M., et al., High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science*, 2005. 307(5715): p. 1621-5.
37. Ozdamar, B., et al., Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors

- controls epithelial cell plasticity. *Science*, 2005. 307(5715): p. 1603-9.
38. Thiery, J.P. and R. Huang, Linking epithelial-mesenchymal transition to the well-known polarity protein Par6. *Dev Cell*, 2005. 8(4): p. 456-8.
  39. Aigner, K., et al., The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene*, 2007. 26(49): p. 6979-88.
  40. Whiteman, E.L., et al., The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene*, 2008. 27(27): p. 3875-9.
  41. Tepass, U., Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays*, 2002. 24(8): p. 690-5.
  42. Tepass, U., et al., Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet*, 2001. 35: p. 747-84.
  43. Shin, K., V.C. Fogg, and B. Margolis, Tight Junctions and Cell Polarity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006. 22(1): p. 207-235.
  44. Knust, E. and O. Bossinger, Composition and Formation of Intercellular Junctions in Epithelial Cells. *Science*, 2002. 298(5600): p. 1955-1959.
  45. Benais-Pont, G., K. Matter, and M.S. Balda, Tight Junctions. 2001.
  46. Matter, K., Epithelial polarity: sorting out the sorters. *Curr Biol*, 2000. 10(1): p. R39-42.
  47. Margolis, B. and J.P. Borg, Apicobasal polarity complexes. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 22): p. 5157-9.
  48. Bachmann, A., et al., *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature*, 2001. 414(6864): p. 638-43.
  49. Hong, Y., et al., *Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature*, 2001. 414(6864): p. 634-8.
  50. Medina, E., et al., Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. *J Cell Biol*, 2002. 158(5): p. 941-51.
  51. Straight, S.W., et al., Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity

- defects. *Mol Biol Cell*, 2004. 15(4): p. 1981-90.
52. Lemmers, C., et al., hINADI/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem*, 2002. 277(28): p. 25408-15.
53. Michel, D., et al., PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 17): p. 4049-57.
54. Macara, I.G., Par proteins: partners in polarization. *Curr Biol*, 2004. 14(4): p. R160-2.
55. Macara, I.G., Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(3): p. 220-31.
56. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(1): p. 67-72.
57. Shi, S.H., L.Y. Jan, and Y.N. Jan, Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell*, 2003. 112(1): p. 63-75.
58. Betschinger, J., K. Mechtler, and J.A. Knoblich, The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature*, 2003. 422(6929): p. 326-30.
59. Plant, P.J., et al., A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol*, 2003. 5(4): p. 301-8.
60. Yamanaka, T., et al., Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol*, 2003. 13(9): p. 734-43.
61. Johansson, A., M. Driessens, and P. Aspenstrom, The mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1. *J Cell Sci*, 2000. 113 ( Pt 18): p. 3267-75.
62. Lin, D., et al., A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol*, 2000. 2(8): p. 540-7.
63. Noda, Y., et al., Human homologues of the *Caenorhabditis elegans* cell polarity protein PAR6 as an adaptor that links the small GTPases Rac and Cdc42 to atypical protein kinase C. *Genes Cells*, 2001. 6(2): p. 107-19.

64. Mertens, A.E., et al., The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol*, 2005. 170(7): p. 1029-37.
65. Bilder, D., Epithelial polarity and proliferation control: links from the Drosophila neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev*, 2004. 18(16): p. 1909-25.
66. Zeitler, J., et al., Domains controlling cell polarity and proliferation in the Drosophila tumor suppressor Scribble. *J Cell Biol*, 2004. 167(6): p. 1137-46.
67. Musch, A., et al., Mammalian homolog of Drosophila tumor suppressor lethal (2) giant larvae interacts with basolateral exocytic machinery in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(1): p. 158-68.
68. Audebert, S., et al., Mammalian Scribble forms a tight complex with the betaPIX exchange factor. *Curr Biol*, 2004. 14(11): p. 987-95.
69. Hurd, T.W., et al., Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol*, 2003. 5(2): p. 137-42.
70. Wang, Q., T.W. Hurd, and B. Margolis, Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust. *J Biol Chem*, 2004. 279(29): p. 30715-21.
71. Lemmers, C., et al., CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 2004. 15(3): p. 1324-33.
72. Tepass, U., C. Theres, and E. Knust, crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell*, 1990. 61(5): p. 787-99.
73. Nusslein-Volhard, C., H. Kluding, and G. Jurgens, Genes affecting the segmental subdivision of the Drosophila embryo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1985. 50: p. 145-54.
74. Medina, E., et al., Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in Drosophila and mammalian epithelial cells. *Biol Cell*, 2002. 94(6): p. 305-13.
75. Klebes, A. and E. Knust, A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in Drosophila. *Curr Biol*, 2000. 10(2): p.

- 76-85.
76. Hubbard, T., et al., Ensembl 2005. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(Database issue): p. D447-53.
77. Karolchik, D., et al., The UCSC Genome Browser Database. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(1): p. 51-4.
78. Richard, M., et al., Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies. *Hum Mol Genet*, 2006. 15 Spec No 2: p. R235-43.
79. den Hollander, A.I., et al., Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *Am J Hum Genet*, 2001. 69(1): p. 198-203.
80. den Hollander, A.I., et al., Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet*, 1999. 23(2): p. 217-21.
81. Makarova, O., et al., Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene*, 2003. 302(1-2): p. 21-9.
82. Pellikka, M., et al., Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature*, 2002. 416(6877): p. 143-9.
83. van den Hurk, J.A., et al., Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Mol Vis*, 2005. 11: p. 263-73.
84. Gene, N.-E.,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=92359&log\\$=genesensor1&logdbfrom=pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=92359&log$=genesensor1&logdbfrom=pubmed). 2009.
85. Makarova, O., et al., Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene*, 2002. 302: p. 21-29.
86. Roh, M.H., et al., The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 14): p. 2895-906.
87. Fogg, V.C., C.J. Liu, and B. Margolis, Multiple regions of Crumbs3 are required for tight junction formation in MCF10A cells. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 13): p. 2859-69.
88. Fan, S., et al., A novel Crumbs3 isoform regulates cell division and ciliogenesis via

- importin {beta} interactions. *J. Cell Biol.*, 2007: p. jcb.200609096.
89. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
90. Sotillos, S., et al., DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol*, 2004. 166(4): p. 549-57.
91. Hoshino, M., T. Yoshimori, and S. Nakamura, Small GTPase proteins Rin and Rit Bind to PAR6 GTP-dependently and regulate cell transformation. *J Biol Chem*, 2005. 280(24): p. 22868-74.
92. Gao, L., G. Joberty, and I.G. Macara, Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by Par6. *Curr Biol*, 2002. 12(3): p. 221-5.
93. Kenny, P.A., et al., The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol*, 2007. 1(1): p. 84-96.
94. Polette, M., et al., Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 2005. 65(17): p. 7691-8.
95. Horne-Badovinac, S. and D. Bilder, Dynein regulates epithelial polarity and the apical localization of stardust A mRNA. *PLoS Genet*, 2008. 4(1): p. e8.
96. Li, Z., et al., Dynein-mediated apical localization of crumbs transcripts is required for Crumbs activity in epithelial polarity. *J Cell Biol*, 2008. 180(1): p. 31-8.
97. Penkert, R.R., H.M. DiVittorio, and K.E. Prehoda, Internal recognition through PDZ domain plasticity in the Par-6-Pals1 complex. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. 11(11): p. 1122-7.
98. Qiu, R.G., A. Abo, and G. Steven Martin, A human homolog of the *C. elegans* polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKCzeta signaling and cell transformation. *Curr Biol*, 2000. 10(12): p. 697-707.
99. Iden, S. and J.G. Collard, Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(11): p. 846-59.
100. Zohn, I.M., et al., Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene*, 1998. 17(11 Reviews): p. 1415-38.

101. Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey, Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, 1997. 11(18): p. 2295-322.
102. Mott, J.D. and Z. Werb, Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(5): p. 558-64.
103. Lacroix, M. and G. Leclercq, Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. 83(3): p. 249-89.
104. Chambers, A.F., MDA-MB-435 and M14 Cell Lines: Identical but not M14 Melanoma? *Cancer Res*, 2009.
105. Nolan, M.E., et al., The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. *Cancer Res*, 2008. 68(20): p. 8201-9.
106. Grise, F., A. Bidaud, and V. Moreau, Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2009. 1795(2): p. 137-151.
107. Kim, S.H., Z. Li, and D.B. Sacks, E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J Biol Chem*, 2000. 275(47): p. 36999-7005.
108. Jadeski, L., et al., IQGAP1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of human breast epithelial cells. *J Biol Chem*, 2008. 283(2): p. 1008-17.
109. Wickliffe, K., et al., The multiple layers of ubiquitin-dependent cell cycle control. *Chem Rev*, 2009. 109(4): p. 1537-48.
110. Etienne-Manneville, S., Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene*, 2008. 27(55): p. 6970-80.
111. Cavatorta, A.L., et al., Differential expression of the human homologue of drosophila discs large oncosuppressor in histologic samples from human papillomavirus-associated lesions as a marker for progression to malignancy. *Int J Cancer*, 2004. 111(3): p. 373-80.
112. Gardiol, D., et al., Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression. *Int J Cancer*, 2006. 119(6): p. 1285-90.
113. Thomas, M., et al., Analysis of specificity determinants in the interactions of different

- HPV E6 proteins with their PDZ domain-containing substrates. *Virology*, 2008. 376(2): p. 371-8.
114. Regala, R.P., et al., Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(19): p. 8905-11.
115. Regala, R.P., et al., Atypical protein kinase Ciota plays a critical role in human lung cancer cell growth and tumorigenicity. *J Biol Chem*, 2005. 280(35): p. 31109-15.
116. Fields, A.P., L.A. Frederick, and R.P. Regala, Targeting the oncogenic protein kinase Ciota signalling pathway for the treatment of cancer. *Biochem Soc Trans*, 2007. 35(Pt 5): p. 996-1000.
117. Cavalli, V., M. Corti, and J. Gruenberg, Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. *FEBS Lett*, 2001. 498(2-3): p. 190-6.
118. Meng, Y., et al., Translocation of Fas by LPA prevents ovarian cancer cells from anti-Fas-induced apoptosis. *Gynecol Oncol*, 2005. 96(2): p. 462-9.
119. Ginty, F., et al., The relative distribution of membranous and cytoplasmic met is a prognostic indicator in stage I and II colon cancer. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(12): p. 3814-22.

## 7 Anhang

**Tab. 7.1: Häufig verwendete Laborgeräte und deren Hersteller**

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller / Vertreiber</b>	<b>Firmensitz</b>
Analysenwaage Satorius BP6100	MS Laborgeräte	Heidelberg
Analysenwaage Satorius CP2245	MS Laborgeräte	Heidelberg
Biofuge pico Heraeus	Kendro	Langenselbold
DAKO Färbeautomat	DAKO Diagnostika GmbH	Hamburg
Dampfsterilisator	H+P	Oberschleißheim
Digitale Bildverarbeitung KAPPA	KAPPA opto-electronics GmbH	Gleichen
DNA Engine PTC-200	MJ Research	Waltham, USA
Durchlichtmikroskop mit Kamera	Leica Mikroskopie und Systeme GmbH	Wetzlar
Durchlichtmikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH	Wetzlar
Filmentwickler Hyperprocessor	Amersham Biosciences	Buckinghamshire, UK
Geldokumentations-System GeneGenius 2	Syngene	Cambridge, UK
Gelkammer ComPor L Mini	Bioplastics RV	Landgraaf, NL
Geltrockner 583	Bio-Rad	München
Gießstand Hoefer	Amersham Biosciences	Buckinghamshire, UK
Heizblock DRI-BLOCK® DB-2A	Techne	Staffordshire, UK
Hera150-Brutschrank Heraeus	Kendro	Langenselbold
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf AG	Hamburg
Mikrowelle	Promicro	München
Minigelkammern Hoefer SE 250	Amersham Biosciences	Buckinghamshire, UK
Netzteil E143	Consort	Turnhout, BE
Netzteil E835	Consort	Turnhout, BE
pH-Meter inoLab	WTW	Heidelberg
Photometer 6131	Eppendorf AG	Hamburg
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Reagenzglas-Mischer	neoLab	Heidelberg
Realplex <sup>4</sup> Mastercycler eppgradient S	Eppendorf AG	Hamburg
Rollmischer Stuart SRT1	Bibby Sterilin	Staffordshire, UK
Scanner Epson 1680	LaserSoft Imaging AG	Kiel
Schüttler	Heidolph Instruments GmbH	Schwabach
Semidry-Blotapparatur	Bio-Rad	München

Thermocycler Flexigene	Techne	Staffordshire, UK
Trockenschrank Heraeus B12	Kendro	Langselbold
Vortex-Genie 2	Scientific Industries	New York, USA
Wasserbad GFL-1003	GmbH für Labortechnik	Burgwedel
Zentrifuge Heraeus 3S-R	Kendro	Langselbold
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich	Villingen-Schwenningen

**Tab. 7.2: Vektoren und Expressionsplasmide**

Bezeichnung	Experiment	Größe	Referenz
pBluescript II SK(+)	4.6.2	2961 bp	Stratagene; La Jolla, USA
pFLAG-CMV <sup>TM</sup> -3	4.1.2	6271 bp	Sigma-Aldrich; München
pGEX-2T	4.2.4	~4900 bp	Amersham Biosciences; Buckinghamshire, UK
pMXs	4.1.1 / 4.2.2	5871 bp	Kitamura et.al
pIRES-N1	4.1.2	5284 bp	Dr. Hobbs, ICR; London, UK
pTRE-Tight	4.5.1	2600 bp	Clontech; Mountain View, USA

**Tab. 7.3: Für PCR-Analysen und Klonierungen verwendete Oligonukleotide**

Name	Art	Experiment	Ziel	Nukleotidsequenz
MP25-12	5'	4.1.1	CRB3	GCGCCCGGGAATTCTGAATAGCCCCATCCT CCTTGACC
MP25-4	3'	4.1.1	CRB3	GCGCCCGGGAATTCCTCGGCGCTGCCAACC CGCCACC
Crb3-1	5'	4.1.2 / 4.4.2	CRB3	GCGCCGGAATTCGCAAATACAGACCACTTCT GC
Crb3-2	3'	4.1.2 / 4.4.2	CRB3	GCGCCGGGATCCATCCTCTCTTGACCTCAG G
Crb3-4	5'	4.2.2	CRB3	GCGCATAGGATCCGTGCGGAAGCTTCGGGA GAAG
Crb3-5	3'	4.2.2	CRB3	GCGCATAGAATTCCCATCCTCTCTTGATCTC AGG
Crb3-as1-100	3'	4.2.2	CRB3	GCGCATGAGGATCCCTACTGCTCCTCGCTA CTGGGCCGGTAGG
Crb3-ERLI	3'	4.2.2	CRB3A	GCGCATGAGGATCCCTATTCCGGCGGCAAC TTGAGGTTGGG
Crb3-Ila-6	3'	4.1.2	CRB3A	GCGCATGAGGATCCTGGGCAGTGTGGTGG CTGC
Crb3-Ila-7	3'	4.2.2	CRB3A	GCGCATGGCAATGCGGCCGCTCCTGGGCAG TGTGGTGGCTGC

Crb3-Ila-9-XhoI	3'	4.1.2	CRB3A	GCGCATGACTCGAGTGGGCAGTGTGGTGGCTGC
Crb3-IIIb-8	3'	4.2.2	CRB3B	GCGCATGGCAATGCGGCCGCCATCCTCTCTTGATCTCAGG
Crb3-IIIb-10-XhoI	3'	4.1.2	CRB3B	GCGCATGACTCGAGCCATCCTCTCTTGACCTCAGG
FLAG-Crb3-XhoI	5'	4.1.2	pFLAG-CMV-3-Vektor	GCGCATGACTCGAGATCGATCTACCATGTCTGCAG
pMX-1	5'	4.1.1	pMXs-Vektor	GGGTGGACCATCCTCTAGACTGC
pMX-2	3'	4.1.1	pMXs-Vektor	AACCTACAGGTGGGGTCTTTCATTCC

**Tab. 7.4 Für quantitative Realtime-PCR eingesetzte Oligonukleotide**

Name	Art	Experiment	Zielgen	Sequenz
Cflar	5'	4.3.1	Cflar	CAGGCTTCGCTCCCAAATTG
Cflar	3'	4.3.1	Cflar	CTGGTACTCCATACACTGGCT
Fas	5'	4.3.1	Fas	TGCAAGTGCAAACCAGACTTC
Fas	3'	4.3.1	Fas	GTCAACAACCATAGGCGATTTCT
Hoxb5	5'	4.3.1	Hoxb5	GGGCCAGACGGAAAAAGGG
Hoxb5	3'	4.3.1	Hoxb5	GGCGATCTCGATACGTCTG
Itgb3	5'	4.3.1	Itgb3	CCCCGATGTAACCTGAAGGAG
Itgb3	3'	4.3.1	Itgb3	ATCTGGCCGTAGTCGAAGGA
Notch1	5'	4.3.1	Notch1	GCCGCAAGAGGCTTGAGAT
Notch1	3'	4.3.1	Notch1	GGAGTCCTGGCATCGTTGG
Adcy7	5'	4.3.1	Adcy7	AAGGGGCGCTACTTCCTAAAT
Adcy7	3'	4.3.1	Adcy7	GTGTCTGCGGAGATCCTCA
Arhgap29	5'	4.3.1	Arhgap29	AGCAAACGAACACTACAAAGTCT
Arhgap29	3'	4.3.1	Arhgap29	GGGACTGTAAACTGTTGGCAA
Gnb4	5'	4.3.1	Gnb4	CAGGAGGCTGAACAGCTTCG
Gnb4	3'	4.3.1	Gnb4	GGCCCACGGAGTCCATATTA
Pde1a	5'	4.3.1	Pde1a	ATGTGTGGATTGCTCCCGTG
Pde1a	3'	4.3.1	Pde1a	GGCGTTTTCCAATTCTTCGATGT
Tnc	5'	4.3.1	Tnc	GCTACCGACGGGATCTTCG
Tnc	3'	4.3.1	Tnc	TAGCCGTGGTACTGATGGTTT

**Tab. 7.5: Für DNA-Sequenzierungsanalysen verwendete Primer**

Name	Art	Experiment	Ziel	Nukleotidsequenz
pFLAG-CMV-3-S	5'	4.1.2	pFLAG-CMV-3-Vektor	ATGTCTGCACTTCTGATCCTAGC
pTRE-Tight-S1	5'	4.5.1	pTRE-Tight-Vektor	CGTTTAGTGAACCGTCAGATCG
pTRE-Tight-S2	3'	4.6.2	pTRE-Tight-Vektor	CGTCGACAAGCTTATCGATGCG
pIRES-S1	5'	4.1.2	pIRES-N1-Vektor	GTCCACTCCCAGTTCAATTACAGC
pIRES-S2	3'	4.1.2	pIRES-N1-Vektor	CTTCCAGAGGAAGCTTCCCTTCACG
M13	5'	4.6.2	pBlueskriptII SK+	GTAAAACGACGGCCAGT
pMX-1	5'	4.2.2	pMXs-Vektor	GGTGGACCATCCTCTAGACTGC
pMX-2	3'	4.2.2	pMXs-Vektor	AACCTACAGGTGGGGTCTTTCATTCC

**Tab. 7.6: Zur Einführung zielgerichteter Mutationen verwendete Primer**

Name	Art	Experiment	Ziel	Nukleotidsequenz
CRB3B-M1	5'	4.6.2	CRB3B	GCCCCTCAGGACTCCA <u>G</u> GGAGACGGTGCAGGGC
CRB3B-M2	3'	4.6.2	CRB3B	GCCCTGCACCGTCTCC <u>C</u> TGAGTCCTGAGGGGC

**Tab. 7.7: Für immunchemische Analysen verwendete Erstantikörper**

Antigen	m*, p*	Spezies	Herkunft
CRB3A	P	Kaninchen	eigene Herstellung (SIGMA Genosys)
CRB3B	P	Kaninchen	eigene Herstellung (SIGMA Genosys)
Cdc-42	P	Kaninchen	Cell Signaling Technologies; Danvers, USA
E-Cadherin	M	Maus	BD Biosciences; Heidelberg
FLAG (M2)	M	Maus	Sigma-Aldrich; München
HSC-70	M	Maus	Invitrogen; Karlsruhe
PALS-1	P	Kaninchen	Upstate; Billerica, USA
PAR6A (H-90)	P	Kaninchen	St. Cruz Biotechnology; St. Cruz, USA
Par6	P	Kaninchen	Abcam; Cambridge, UK
Rac1/2/3	P	Kaninchen	Cell Signaling Technologies; Danvers, USA
ZEB-1	M	Ziege	St.Cruz Biotechnology; St. Cruz, USA
ZO-1	M	Maus	BD Biosciences; Heidelberg

\*: m = monoklonal; p = polyklonal

**Tab. 7.8: Verwendete konjugierte Sekundärantikörper**

Antigen	Spezies	Konjugat	Herkunft
Kaninchen	Schwein	Peroxidase	DakoCytomation; Glostrup, Dänemark
Maus	Kaninchen	Peroxidase	DakoCytomation; Glostrup, Dänemark
Maus	k.A*	Peroxidase	eBiosciences; San Diego, USA
Ziege	Kaninchen	Peroxidase	DakoCytomation; Glostrup, Dänemark
Kaninchen	Affe	Alexa Fluor® 488	Molecular Probes; Karlsruhe
Maus	Kaninchen	Alexa Fluor® 546	Molecular Probes; Karlsruhe

\*: k.A.= keine Angabe

## 8 Abkürzungsverzeichnis

a	apikal
A	Ampere
Abb.	Abbildung
aPKC	atypische Protein Kinase C
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalovirus
Crb / CRB	Crumbs
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DCIS	Ductal carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxyzyklin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transformation
FCS	Fetale Calf Serum; fötales Rinderseum
FLAG	Peptid bestehend aus den Aminosäuren: DYDDDDK
G-418	Geneticin-418
H	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
HSC-70	Heat Shock Protein Cognate 70
IHRES	Internal Ribosomal Entry Site
kD	kilo Dalton
LCIS	Lobular carcinoma in situ
MCS	Multiple Cloning Site

---

min	Minute
mRNA	messenger Ribonucleic acid
NP-40	Nonidet P-40
PALS-1	protein associated with Lin-7 1
PAR; Par	partitioning defective protein
PATJ	protein associated with tight junctions
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Sek	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris buffered acetic acid EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TMA	Tissue Microarray
U	Unit
U/min	Umdrehungen per Minute
ü.N.	über Nacht
V	vakuolär
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Z	zytoplasmatisch

## **9 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe. Des Weiteren versichere ich, die hier vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Susann Schirmer

Hamburg, den 09.Juli 2009

## 10 Danksagung

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel, dem Direktor des Instituts für Tumorbilogie, für die Möglichkeit diese Dissertation an seinem Institut in einem hervorragenden Arbeitsumfeld anfertigen zu können. Ich danke ihm für die fachkundige Begleitung und die stetige Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Konrad Wiese danke ich für die Bereitschaft diese Dissertation seitens des Departments Biologie der Universität Hamburg zu begutachten.

Bei Dr. Volker Assmann möchte ich mich ganz ausdrücklich für die Bereitstellung dieses interessanten Projekts, sowie für die rundum exzellente Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Seine Ideen, Anregungen und nicht zuletzt das Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, haben ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Dr. Sabine Riethdorf, Dr. Lutz Riethdorf und Malgorzata Stoupiec bedanke ich mich ganz herzlich für das große Engagement bei der Durchführung und Auswertung der immunhistologischen Studien.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Tumorbilogie für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag und auch für den wissenschaftlichen Austausch.

Dr. Stefan Werner danke ich ganz besonders für die seelische, moralische und praktische Unterstützung bei manchem Experiment, und vor allem danke ich ihm für das allzeit harmonische und aufheiternde Arbeitsklima in unserem Labor.

Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher, Kornelia Burger und Susanne Feldhaus danke ich für die fachkundige Begleitung der tierexperimentellen Arbeiten.

Sabrina Föge und Marcel Krepstakies danke ich für das Korrigieren dieser Arbeit.

Meinen Mitbewohnern Britta, Christina und Marcel danke ich für das wunderbar unkomplizierte und ausgesprochen lustige Zusammenleben in unserer WG.

Ich danke all meinen Freunden, ganz besonders „meinen Mädels“ aus der Heimat, weil mit ihnen einfach alles leichter ist.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich aufrichtig und aus tiefstem Herzen für die bedingungslose Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir in allen Lebenslagen geben.