

Die Rolle des p38 - Signalweges bei Ras - vermittelten
Tumorinvasionsprozessen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Konrad Arnulf Otto BINDER

2016

Dekan: Professor. Dr. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Knipper

2. Berichterstatter: Professor Dr. H - P. Rodemann

Widmung

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Widmung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1.0 Einleitung

- 1.1 Epidemiologie der Tumorsterblichkeit und Rolle des Ras-Onkogens
- 1.2 Übersicht über den physiologischen Ras-/MAPK-Signalweg
 - 1.2.1 Rolle der MAPK JNK in der Zellregulation
 - 1.2.2 Rolle der MAPK ERK in der Zellregulation
 - 1.2.3 Rolle der MAPK p38 in der Zellregulation
- 1.3 Übersicht über den pathologischen MAPK/SAPK p38 Signalweg nach onkogener Ras-Transformation
- 1.4 Fragestellung

2.0 Material und Methoden

- 2.1 Zell-Linien zur Analyse der Ras-/MAPK-Signaltransduktion
 - 2.1.1 Nicht transfizierter NIH-3T3 Klon
 - 2.1.2 Stabil mit H-Ras-transfizierter NIH-3T3 Klon
- 2.2 Handhabung von Mausfibroblasten
 - 2.2.1 Mausfibroblasten in Kultur nehmen
 - 2.2.2 Einfrieren der Mausfibroblasten
 - 2.2.3 Splitting und Auszählen der Mausfibroblasten
 - 2.2.4 Zell-Lysierung zur Gewinnung der Ras-/MAPK-Signalproteine
 - 2.2.5 Analyse der Konzentration von Ras-/MAPK-Signalproteinen
 - 2.2.6 Proteinkonzentration der der Ras-/MAPK-Signalproteine
- 2.3 Transfektionen von NIH-3T3-Mausfibroblasten zur Analyse des Ras-/MAPK-Signalweges
 - 2.3.1 Transiente Transfektion von NIH-3T3-Mausfibroblasten zur Analyse des Ras-/MAPK-Signalweges

- 2.3.2 Stabile Transfektion von NIH-3T3-Mausfibroblasten zur Analyse des Ras- / MAPK-Signalweges
- 2.4 Plasmide und Vektoren zur Transfektion von NIH-3T-Zellen
 - 2.4.1 Verwendete Plasmide zur Transfektion von NIH-3T3-Zellen
 - 2.4.2 Verwendete Vektoren zur Transfektion von NIH-3T3-Zellen
- 2.5 Immunoblot zur Analyse des Ras- / MAPK-Signalweges
 - 2.5.1 Immunoblot
 - 2.5.2 verwendete Puffer
 - 2.5.3 Herstellung von Acrylamidgel
 - 2.5.4 Durchführung der Elektrophorese
 - 2.5.5 Western Blot zum Nachweis von Urokinase in NIH-3T3-Zellen
 - 2.5.6 Western Blot zum Nachweis von p38 in NIH-3T3-Zellen
 - 2.5.7 Immunopräzipitation von p38 in NIH-3T3-Zellen
 - 2.5.8 Immunopräzipitation von Ras in NIH-3T3-Zellen
- 2.6 *In-vitro* Invasionsassay zur Analyse der invadierter NIH-3T3-Zellen
 - 2.6.1 Funktionsprinzip
 - 2.6.2 Auswertung der Invasionsaktivität von NIH-3T-Zellen mittels MTT-Test
 - 2.6.3 Auswertung der Invasionsaktivität von NIH-3T3-Zellen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie
- 3.0 Ergebnisse**
 - 3.1 Etablierung eines Verfahrens zur Detektion der Ras-/p38- Signalkaskade in immortalisierten NIH-3T3-Zellen (Mausfibroblasten)
 - 3.1.1 Analyse der Rolle von p38 für das Invasionsverhalten von immortalisierten NIH-3T3 Zell-Linien
 - 3.2 Analyse und des Ras- /p38-vermittelten Signalweges in immortalisierten NIH-3T3 Zellen
 - 3.2.1 Analyse der Ras-/p38-Signalkaskade mittels Ras-Immunopräzipitation
 - 3.2.2 Analyse der Ras-/p38-Signalkaskade mittels p38-Western Blot
 - 3.3.3 Analyse der Ras-/p38-Signalkaskade mittels p38-Immunopräzipitation
 - 3.3.4 Analyse der Ras-/p38-Signalkaskade mittels u-PA Western Blot
 - 3.3.5 Analyse der Ras-vermittelten Induktion des u-PA-CAT-Promoters auf mRNA-Ebene (Fremdergebnis innerhalb der Arbeitsgruppe)

3.3 Analyse des Ras-/ p38-vermittelten Signalweges in immortalisierten NIH-3T3 Zellen im *in-vitro*-Invasionsassay:

4.0 Diskussion

4.1 Die Isoform p38 α MAPK vermittelt eine Ras-induzierte Urokinase-Expression in NIH-3T3 Zellen

4.2 Die Invasionspotenz von Mausfibroblasten wird über eine Ras-/p38 α -induzierte u-PA-Aktivierung erhöht

4.3 Die Invasionspotenz infiltrierender Mausfibroblastenzellen Auswertung kann im *in-vitro*-Invasionsassays verfolgt werden

5.0 Zusammenfassung

6.0 Literaturverzeichnis

7.0 Erklärung zum Eigenanteil

8.0 Veröffentlichung

9.0 Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

Ala:	Alanin
AP-1:	Activating Protein 1
APS:	Ammoniumpersulfat
ARF:	Alternative reading frame
ATF:	Activating Transcription Factor
Arg:	Arginin
Asn:	Asparagin
BAC:	Bacterial Artificial Chromosome
CAM:	Cell Adhesion Molecule
CAT:	Chloramphenicol Transferase
CDK:	Cyclin dependant kinase
CHOB:	CREB homologous Protein
CIP:	CDK interacting protein
CKI:	Cyclin dependant kinase inhibitors
CRE:	CAMP responsive element
CREB:	cAMP Response Element Binding Protein
CSF:	Colony Stimulating Factor
Cys:	Cystein
DMSO:	Dimethylsulfoxide
ECL:	Chemiluminescence Detection Kit
EGF(R):	Epidermal Growth Factor (Receptor)
Egr-1:	Early growth response 1 Transkriptionsfaktor
ERK:	Extracellular regulated Kinase
EZM:	Extrazellulärmatrix
FAK:	Focal Adhesion Kinase
GAP:	GTP'ase activating Protein
GEF:	Guanine exchanging Factor
GFP:	Green Fluorescent Protein
Gln:	Glutamin
Glu:	Glutaminsäure
Gly:	Glycin
GRB 2:	Growth Factor Receptor - bound Protein 2
FOXM1:	Forkhead box M1
HAEC:	Human Artificial Episomal Chromosome
His:	Histidin
IGF:	Insulin like Growth Factor
Ile:	Isoleucin
INK 4:	Inhibitors of CDK 4
JNK(K):	C - Jun terminale Kinase (Kinase)
Lasp 1:	Lim, Actin and SH3 Domain Protein
Leu:	Leucin
LPS:	Lipopolysaccharide
MMAC:	Mutated in multiple advanced cancers
MAPK:	Mitogen activated Protein Kinase
MEK:	MAPK Kinase
Met:	Methionin

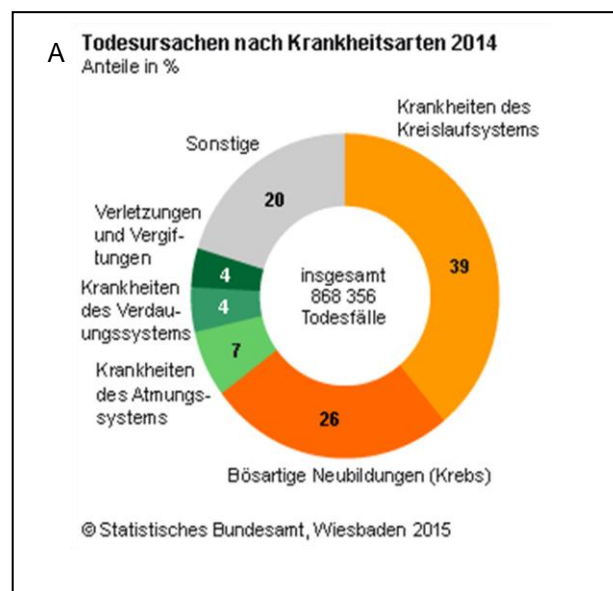
MKK:	MAPK Kinase
MKKK:	MAPK Kinase Kinase
MLB:	Mg - Lysis/Wash buffer
MT1 - MMP:	Membrane - type 1 Matrixmetalloproteinase
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NF κ B:	Nuclear transcription factor κ B
LSM:	Laserscanmikroskop
PAC:	P1 artificial chromosome
PAI:	Plasminogen activator inhibitor
PBS:	Phosphate buffered saline
PDGF(R):	Platelet Derived Growth Factor (Receptor)
Phe:	Phenylalanin
PP5:	Serin/Threonin Protein Phosphatase type 5
Pro:	Prolin
PTEN:	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom ten
RBD:	Ras binding domain
SAPK:	Stress activated Protein Kinase
SDS-Page:	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Ser:	Serin
SOS:	Son of Sevenless
TEMED:	N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine
Thr:	Threonin
TNF:	Tumornekrosefaktor
TPA:	Phorbol 12-tetradecanoate 13-acetate
TRE:	TPA responsive element
Trp:	Tryptophan
Tyr:	Tyrosin
u-PA :	Urokinase Plasminogen Activator (= Urokinase)
u-PAR:	Urokinase Plasminogen Activator Receptor
Val:	Valin
VCAM:	Vascular cell adhesion molecule
YAC:	Yeast Artificial Chromosome

1.0 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Tumorsterblichkeit und Rolle des Ras-Onkogens

Nach Angabe des Bundesamtes für Statistik der Bundesrepublik Deutschland belief sich der Mortalitätsanteil bösartiger Neubildungen im Jahr 2014 auf 25,8% (223 758 Menschen) der Gesamtmortalität und stellte die zweitgrößte Gruppe der Todesursachen (Abb. 1). Dabei bewegt sich der Anteil der Tumorsterblichkeit mit 25% seit Jahren auf stabilem Niveau. Vor diesem Hintergrund ist die molekulare Aufschlüsselung der mutagenen Signaltransduktion mit ihren pleiotropen Effekten weiterhin ein aktuelles Ziel.

Die maligne Transformation ist pleiotrop bedingt und führt über eine modifizierte Signalkaskade zu intra- und extrazellulären Veränderungen des Mitosezyklus, der Proteolyse oder der Kontaktinhibition. Dabei spielen die Inaktivierung rezessiver Tumorsuppressorgene, die Aktivierung dominanter Proto-Onkogene durch Mutation zu Onkogenen oder Mutationen



B

Sterbefälle insgesamt 2014

ICD-10	Bösartige Neubildung	Gestorbene	Anteil in %
C34	der Bronchien und der Lunge (Lungen- und Bronchialkrebs)	45 049	19,5
C50	der Brustdrüse (Brustdrüsenkrebs (Mamma))	17 804	7,7
C18	des Kolons (Dickdarmkrebs)	16 899	7,3
C25	des Pankreas (Bauchspeicheldrüsenkrebs)	16 615	7,2
C80	ohne Angabe der Lokalisation	9 665	4,2
C16	des Magens	9 610	4,2
C22	der Leber und der intrahepatischen Gallengänge	7 686	3,3
C20	des Rektums (Mastdarm oder Enddarm)	7 605	3,3
C71	des Gehirns	6 001	2,6
C67	der Harnblase	5 692	2,5

Abb. 1: Angabe des Statistischen Bundesamtes Wiesbaden von 2015, Aufgliederung der Todesursachen (A) und Tumorart (B)

der DNS wie Translokation, Punktmutation, Deletion, Amplifikation oder Demethylierung eine Rolle. Diese Zusammenhänge wurden bereits früh erkannt und werden bis heute in der aktuellen Literatur aufgegriffen (Uemara et al., 2003; Simin et al., 2004; Nasr et al., 2003; Sangrar et al., 2015).

Als biologischer Endpunkt findet sich über die akquirierte metastatische Kompetenz die Fähigkeit zur Migration, Adhäsion und Invasion. Hernández-Alcoceba und Kollegen veranschaulichten die sequentiellen Schritte (abgewandeltes Modell siehe Abb. 2), auch in der neueren Literatur wurde das Modell 2014 von Capp und Kollegen erneut benannt (Hernández et al., 2000, Capp et al., 2014).

Dabei hat sich eine prominente Rolle des Ras-Onkogens mit nachfolgend aktivierter MAPK-Signalkaskade für Tumorinvasionsprozesse gezeigt: So wird aktuell eine Tumorassoziation in 30% der Gesamttumoren postuliert. Dabei spielt die onkogene Transformation von N-Ras, K-Ras und H-Ras in absteigender Relevanz eine Rolle (Zhang et al., 2016).

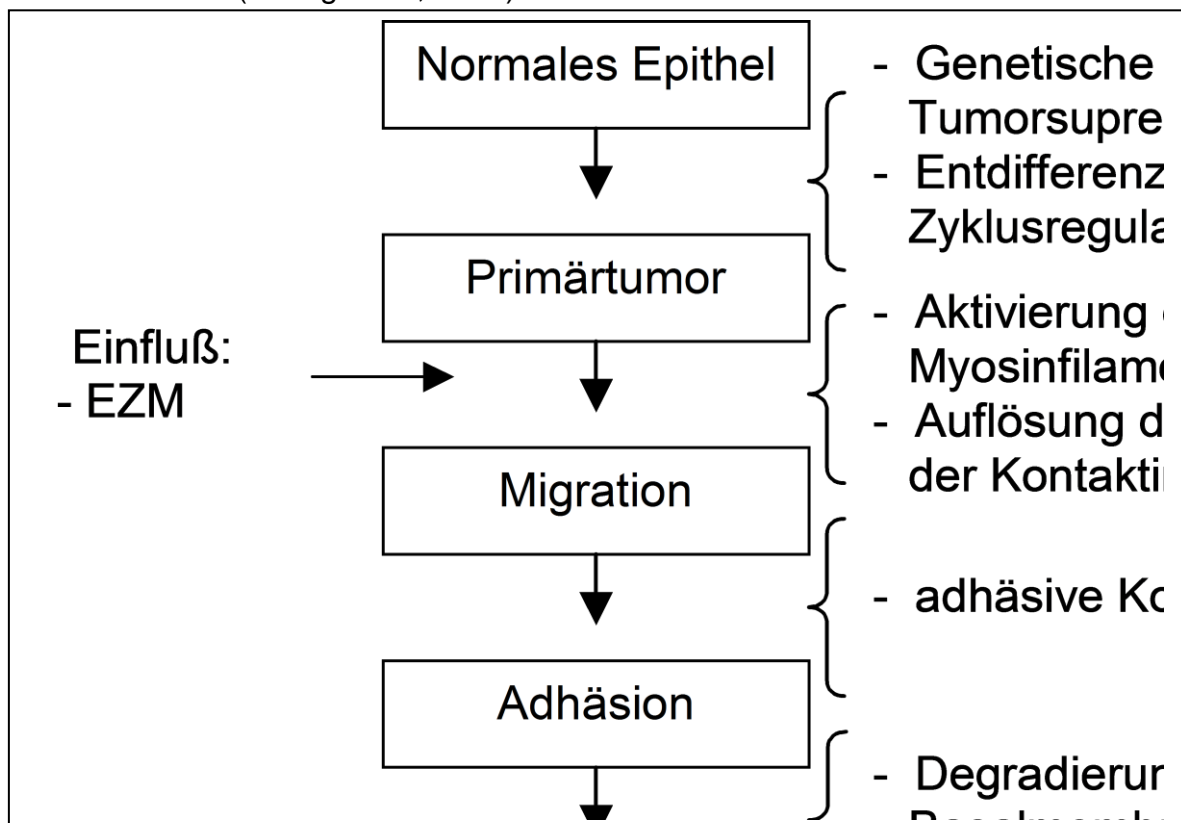


Abb. 2: Multifaktorielle Tumorgenese und Erwerb metastatischer Kompetenz nach Hernández-Alcoceba, R. und Mareel, M. et al., 2000, eigenständig modifiziertes Schaubild

1.2 Übersicht über den physiologischen Ras-/MAPK-Signalweges

Das Ras-Protein ist ein kleines, membranassoziertes, monomeres Guanin-nucleotid-bindendes Protein (G-Protein) mit einer Molekularmasse von 21 kDa.

Kennzeichen ist seine intrinsische GTP'ase Aktivität, die durch Hydrolyse das aktive GTP in seine inaktive Form (GDP) überführt (Bourne *et al.*, 1991). Um eine dreidimensionale Vorstellung des in-

aktiven und aktiven Ras-Proteins zu ermöglichen, ist unter der Abbildung 3 ein 3-

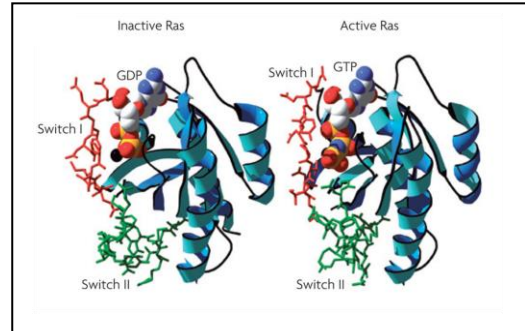


Abb. 3: Darstellung des inaktiven und aktiven Ras-Proteins, Karnoub *et al.* 2008

D Modell von der Arbeitsgruppe Karnoub und Kollegen dargestellt (Karnoub and Weinberg RA, 2008). Das Ras-Protein ist verantwortlich für die intrazelluläre mitogene Aktivierung der Proteinkinasewege (MAPK). Zu diesen zählen die Signalproteine ERK (extrazellulär regulierte Kinase), JNK (c-Jun-terminale Kinase) und p38 (Lei *et al.*, 2014), die an der physiologischen Zellregulation beteiligt sind. Der MAPK-Signalweg ist bereits lange im Fokus der Forschung und kann mitogen oder stress-assoziiert aktiviert werden (Cano und Mahadevan, 1995; Han *et al.*, 1995).

Den MAPK und SAPK Signalwegen ist die kaskadenartige Phosphorylierung nachgeordneter Signalproteine durch Threonin- und Serinkinasen („Downstream Targets“) mit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren gemein (Cobb and Goldsmith, 1995). Sie erfahren einen unterschiedlichen Aktivierungsweg: Für die MAPK bedarf es mitogener Stimuli wie EGF, PDGF, Insulin, Phorbolster bis hin zu Thrombin, die zu einer Phosphorylierung des Tyrosinrezeptor führen (Ray and Sturgill, 1988;Denhardt, 1996). Die mitogene Aktivierung zeigt nur eine geringe Induktion SAPK vermittelter Aktivität (Kyriakis *et al.*, 1994). Als adäquater Stimulus der stress-aktivierten Proteinkinase zählen inflammatorische Cytokine wie $TNF\alpha$ oder Interleukin 1 (Kyriakis and Avruch, 1996;Alam *et al.*, 2015) ebenso wie Osmoseschwankung, Anwesenheit von toxischem LPS (Han *et al.*, 1995) oder UV-Licht (Widmann *et al.*, 1999;Dérillard *et al.*, 1994). Deaktivierung der

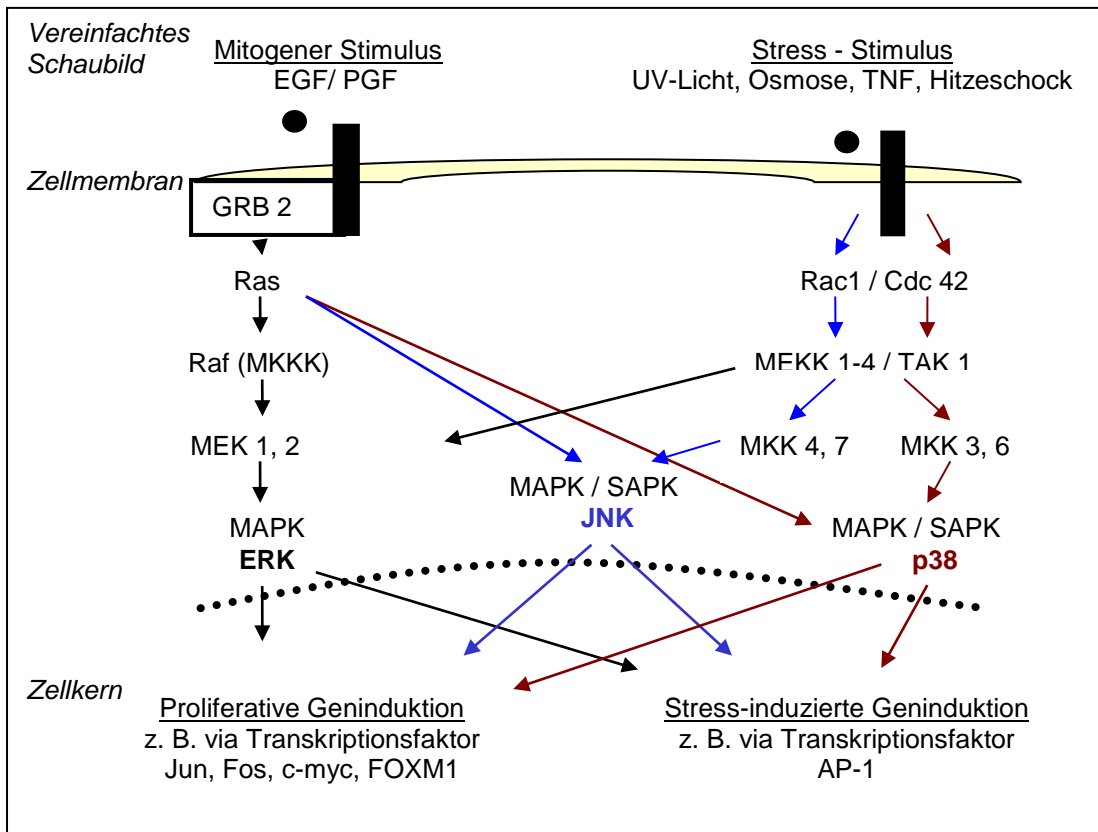


Abb. 4: schematische Übersicht über die Regulation der MAP, eigene Übersicht

phosphorylierten Kinasen erfolgt über Einzel- oder Dualphosphatasen mit Serin- und Threoninspezifität oder Threonin- und Tyrosinspezifität, die als MAP Kinase Phosphatasen bezeichnet werden (Keyse, 2000; Hunter, 1995). Darüber hinaus können die Kinasen über ihre Aktivität stimulierenden oder inhibierenden Einfluß den Signalfuß modulieren (Denhardt, 1996). Eine Übersicht über die drei MAPK/SAPK Signalwege sind in Abbildung 4 aufgeführt.

Durch die MAPK-Kinasen, namentlich MAPK p38, wurde eine Regulation für Apoptose, Adhäsion und Migration sowie Proliferation und Angiogenese über eine abhängige Aktivierung von Wachstumsfaktoren beschrieben (Lin et al., 2016).

Zu den MAPK-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren zählen c-jun, fos, AP-1, SAP 1, Elk 1 und c-myc und FOXM1 oder CHOP (Denhardt et al., 1996; Widmann et al, 1999; Behren et al., 2010; Iurlaro et al., 2015). Hierüber werden Zellwachstum, Zellproliferation und der Zellzyklus reguliert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Regelkreis zwischen der MAP Kinasen und „upstream“

Regulatoren wie beispielsweise dem Tyrosinkinase-Rezeptor oder dem SOS Protein, dem Raf-1 Protein oder den MEK's besteht (Seeger and Krebs, 1995).

Die Struktur der MAP-Kinasen wurde bereits frühzeitig aufgedeckt. Dabei zeigte sich für die MAPK ERK und p38 eine hohe strukturelle Homologie, wie in Abbildung 5 dargestellt (Wang *et al.*, 1997).

Zwischenzeitlich konnte durch das Verfahren der Kernspinresonanzspektroskopie eine weiterführende Bewertung der dreidimensionalen Struktur erreicht werden. Die Substrat-Bindungszone wird als D-

(„Docking“) oder KIM- („kinase interacting motif“) Motiv benannt. Durch das wachsende Verständnis der dreidimensionalen Struktur der MAP-Kinasen wird eine über das D-Motiv hinausgehende Bedeutung einer Konformationsänderung im Hinblick auf die Bindungsspezifität postuliert (Peti und Page, 2013).

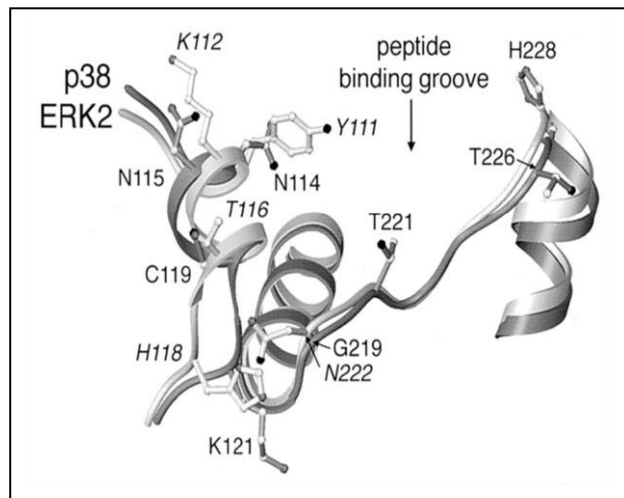


Abb. 5: Gegenüberstellung von der MAPK ERK 2 mit der MAPK/SAPK p38, Aufsicht auf die Bindungsdomäne des Substrates: Nachweis deutlicher Homologie nach Wang, Z. et al., 1997

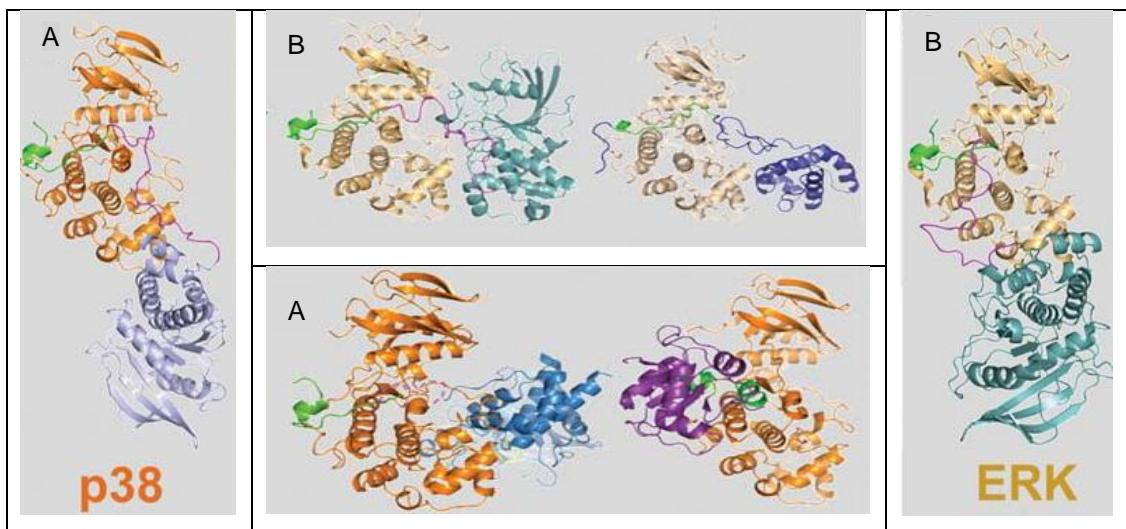


Abb. 6: A links MAPK p38 (braun) mit D-Motiv (grün), A Mitte unten links mit Bindung an STEP (STEP=Striatal-Enriched protein *tyrosine Phosphatase*) und Mitte unten rechts DUSP 16 (DUSP= dual spezifische Phosphatase), B rechts MAPK ERK (beige) mit D-Motiv (grün), B Mitte oben links Bindung HePTP (HePTP= Protein tyrosine phosphatase non-receptor type), B Mitte oben rechts ETS-1 (ETS= E Twenty Six Transkriptionsfaktor), Peti und Page, 2013

Beispielhaft ist in Abbildung 6 die Konformationsänderung von der MAPK 38 und der MAPK ERK in Abhängigkeit von den Bindungspartnern dargestellt, wie von Peti und Page 2013 beschrieben.

1.2.1 Rolle der MAPK JNK in der Zellregulation

Die MAPK JNK (c-Jun-terminal kinase) wird durch die zweifache Phosphorylierung an ihrem Motiv T-P-Y (Thr¹⁸³-Pro-Tyr¹⁸⁵) aktiviert (Shun *et al.*, 2005) und phosphoryliert ihrerseits die Transkriptionsfaktoren bevorzugt an ihrer SH₂ Domäne. Es konnte ein regulativer Einfluß auf die Tumorsuppressorgene DPC4 und p53 (Phosphorylierung an Thr-83) sowie die Transkriptionsfaktoren NFAT, ATF-2, c-myc und c-Jun nachgewiesen werden (Sabatini *et al.*, 2005;Widmann *et al.*, 1999;Buschmann *et al.*, 2001). Dabei zeigen die aus den drei Genen JNK 1, 2 und 3 resultierenden bislang bekannten 10 Isoformen, die durch unterschiedliches „Splicing“ entstehen, divergierende Substratspezifität (Yoshida *et al.*, 2004;Dong *et al.*, 2001). Die MAPK JNK wird überwiegend durch stress-assoziierte Stimuli wie Osmoseschwankung, Bestrahlung oder durch Cytokine wie TNF α und Interleukin über eine Phosphorylierung aktiviert. Neben einer Stressinduktion kommt es ebenfalls Ras-abhängig zu einer Aktivierung der MAPK JNK und seiner Isoformen (Widmann *et al.*, 1999;Dérijard *et al.*, 1994). Biologischer Endpunkt ist neben Apoptose und Cytokininduktion der Einfluss auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Es hat sich gezeigt, dass die biologische Funktion der MAPK JNK je nach Isoform und Gewebevorkommen unterschiedliche Effektor moduliert (Takaesu *et al.*, 2000;Seki *et al.*, 2012).

1.2.2 Rolle der MAPK ERK in der Zellregulation

Die MAPK ERK („extracellular regulated kinase“) wird vom Ras-Protein reguliert und über eine duale Phosphorylierung aktiviert. Über abhängige Transkriptionsfaktoren, z. B. AP-1, Elk 1 oder c-Jun/c-Fos, wird die Zellproliferation und der Zellzyklus reguliert (Denhardt *et al.*, 1996, Widmann *et al.*, 1999; Kidger *et al.*, 2016). Es ist bekannt, dass ein Regelkreis zwischen der MAPK ERK und übergeordneten Signalebenen wie dem Tyrosinkinase-rezeptor, dem SOS Protein, dem Raf-1 Protein oder den MEK's besteht (Segger and Krebs, 1995).

Wie bei der MAPK JNK beschrieben, ist ein wesentlicher Unterschied die führende mitogene Aktivierung.

1.2.3 Rolle der MAPK p38 in der Zellregulation

Das Signalprotein p38 zählt zu den mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK), die einer Regulation des Ras-Proteins unterliegen. Die Proteinkinase besteht aus zwei Domänen: Die N-terminale überwiegend aus β -Faltblattstruktur, die C-terminale überwiegend aus α -helikaler Struktur. Ihre Aktivierung erfolgt über einzelne oder duale Phosphorylierung. Das Phosphorylierungsmotiv (Thr¹⁸⁰ - Gly - Tyr¹⁸²) sitzt zwischen beiden Domänen (Raingeaud et al., 1995; Wang et al., 1997; Peti und Page, 2013). Über transkriptionale Einbindung, beispielsweise c-Jun/C-Fos, CHOB, CREB (Kyriakis and Avruch, 2001), wird Einfluss auf die Migration oder den Zellzyklus bis hin zur Apoptose vermittelt.

Es wurden bislang vier Isoformen der MAPK p38 gefunden (Shi et al, 2002): Es handelt sich um die Isoformen p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ . Bekannt ist ein ubiquitäres Vorkommen der p38-Isoformen α und β , p38 γ hingegen wird muskelspezifischer, p38 δ betont in Haut-, Nieren- und Intestinalgewebe beschrieben (Grossi et al., 2014).

1.3 Übersicht über den pathologischen MAPK/SAPK p38 Signalweg nach onkogener Ras-Transformation

Das Ras-Protein ist ein Proto-Onkogen, das nach mutagener Transformation in einer Vielzahl von gewebeübergreifenden Tumoren nachgewiesen wird (Mekawy et al., 2014). Ras liegt in drei Isoformen, H-Ras, K-Ras und N-Ras vor (Takai et al., 2001), für die auch virale (v Ras) Onkogene mit hoher Homologie zum zellulären Onkogen existieren (Parada et al., 1982).

Eine onkogene Transformation, z. B. Punktmutationen, führt durch konstitutive Hochregulierung der Ras-Aktivität zu einer fehlenden Funktionskontrolle (Stacey and Kung, 1984; Calvert et al., 1996).

Als eine der Ursachen wurden mehrere beteiligte Mutationen in 3 Kodons - Kodon 12, 13 und 61- identifiziert, die zu einer konstitutionellen Hochregulation als Ras-

Onkogen führen (Herreros-Villanueva et al., 2014; Jeong et al., 2015; Wei et al., 2005; Zhang et al., 1994).

Es konnte belegt werden, dass eine onkogene Transformation von Ha-Ras durch Austausch von Glycin an Kodon 12 mit jeder beliebigen Aminosäure mit Ausnahme von Prolin induzierbar ist. Ferner wurde früh erkannt, dass neben der Punktmutation auch über Amplifikation oder über eine abnorme GDP Bindung des Ras-Proteins eine Hochregulation erfahren kann (Seeburg et al., 1984; Barbacid, 1987; Lowy and Willumsen, 1993). Es resultiert eine Ras-Onkogen vermittelte Aktivierung der MAPK ERK, JNK und p38 (Marshall et al., 1996).

Für eine vollendete mutagene Transformation ist, neben einem Einfluss auf die Adhäsion, Migration und Invasion, ebenfalls eine Proteolyse erforderlich.

So wurde bereits gezeigt, dass ein Tumor erst eine metastatische Kompetenz erwerben muss (Hernández et al., 2000; Mareel et al., 2003; Yilmaz und Christofori, 2010): Dazu zählen die Auflösung interzellulärer Adhäsionsverbindungen, Proteolyse der Extrazellulärmatrix und Neovaskularisierung (Porte *et al.*, 1998) sowie am Ort der Fernmetastasierung Extravasation und Invasion (Gaßmann *et al.*, 2004).

Adhäsionsproteine dienen dem Zusammenhalt von Zellen und sind evolutionär über die Arten hinweg konservativ exprimiert worden. Dabei lassen sich die Adhäsionsproteine in die Gruppe der Zell-Zell adhäsiven sowie die Zell-Matrix adhäsiven Proteine unterscheiden (Hynes and Zhao, 2000; Yamada, 1991). Ein wichtiger Vertreter sind die Cadherine: Eine Beteiligung des Cadherins E bei der interzellulären Adhäsion und Cadherin N bei Adhäsionsprozessen mit der Extrazellulärmatrix beschrieben ist belegt (Cavarello und Christofori, 2004).

Cadherine sind kalziumabhängige transmembranäre Proteine, die über dimere Aggregation mit ihren extrazellulären Anteilen als Adhäsionspartner dienen. Intrazellulär besteht eine Anbindung an das Cytoskelett (Troyanovsky, 2005). Differenziert wird zwischen den klassischen Cadherinen (E-, N- und P-Cadherin) mit ihrer transmembranären Proteinstruktur sowie einem untypischen T-Cadherin, das bei identischer extrazellulärer Domäne keinen cytosolischen und transmembranären Anteil aufweist (Zhou *et al.*, 2002). Cadherine sind strukturell für Desmosomen und „Tight-Junctions“ von Bedeutung (Garrod et al.,

2002;Schneeberger and Lynch, 2004). Ein weiteres Beispiel für adhäsives Potential ist die MAPK p38 abhängige Expression der VCAM-1 (Ju *et al.*, 2002), die physiologischerseits eine endovaskuläre Adhärenz von Leukozyten ermöglicht. VCAM konnte unter spezifischer Inhibition des MAPK p38

Tab. 1: Übersicht über Zell- und Matrix adhäsive Proteine (Yamada *et al.*, 1991; Hynes *et al.*, 2000)

<p><u>Zell-Zell adhäsive Proteine</u> Cadherine, Connexine und die Immunglobulin - Superfamilie</p> <p><u>Zell-Matrix adhäsive Proteine</u> Integrine, Laminine, Entactine, Fibronectine, oder Thrombospondin und Proteoglycane, Cadherine</p>
--

Signalweges unterdrückt werden konnte (Ju *et al.*, 2002). Die klinische Relevanz einer VCAM-vermittelte Metastasierung wurde für Brustkrebszellen belegt (Huang *et al.*, 2016). Beispielhafte Vertreter der Adhäsionsproteine sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die MAPK p38-vermittelte Modifikation der Zelladhäsion wird von Walsh und Kollegen in humanen Kolonkarzinomzellen beschrieben: Unter phosphoryliertem p38-Protein lag die FAK („Focal Adhesion Kinase“) vermehrt in ihrer dephosphorylierten inaktiven Form vor, was in einer reduzierten adhäsiven Kompetenz der Tumorzelle resultierte (Walsh *et al.*, 2003).

Neben dem zelladhäsiven Verlust spielt die Migration der Zellen eine weitere Rolle bezüglich der metastatischen Kompetenz.

Die Migration ist auch ein physiologischer Prozess, der zum Beispiel in der Wundheilung oder von Immunzellen genutzt wird (Franz *et al.*, 2002). Sie beruht auf der Funktion der Aktinfilamente, im Zusammenspiel mit der Tyrosinkinase FAK (fokale Adhäsionskinase) für eine cytoskelettale Bewegung zu sorgen. Neben den Aktinfilamenten zählen Intermediärfilamente ebenfalls zum Cytoskelett. Sie sind für die mechanische Stabilität der Zelle verantwortlich und sind ebenso wie die Mikrotubuli ein zentrales Element des Cytoskelettes (Etienne-Manneville, 2004;Strelkov *et al.*, 2003).

Für die Invasion von Zellen ist die cytoskelettale Kontraktion für die Beweglichkeit ebenfalls bedeutsam. *In-vitro* konnte eine FAK-assozierte Migration auf Kollagen Typ IV Fasern nachgewiesen werden. Die FAK-Aktivität ist über den Ras-/ERK Signalweg reguliert (Franitza *et al.*, 2000; Staff *et al.*, 2001; Friedl *et al.*, 2000; Crowe *et al.*, 2004) und führt durch chemotaktische Reize zur Zellmigration. Für kolorektale Adenokarzinomzellen erfolgte über Interleukin 17 eine Expression

von Chemokinrezeptoren (Chien *et al.*, 2015). Die Migration ist in Abbildung 7 beispielhaft bebildert.

Mit Ausnahme der Immunzellen, ist eine Invasion solider Tumorzellen in umgebenes Gewebe ohne proteolytische Degradierung der extrazellulären Matrix nicht möglich. Die Proteasen untergliedern sich entsprechend der Affinität des katalytischen Zentrums in Obergruppen von Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteinasen und können nach pathogener Zelltransformation zu einer hydrolytischen Spaltung der Matrixproteine führen (Stetler-Stevenson and Yu, 2001). Die Urokinase (u-PA) zählt zu den Serinkinasen und reguliert physiologisch die Proteolyse von Plasminogen zu Plasmin. Sie verhält sich zu dem „plasminogen activator inhibitor type“ (PAI-1 und PAI-2) antagonistisch. Beteiligt ist u-PA an der Chemotaxis, Migration oder Angiogenese, aber auch bei Tumordinvasion. Eine hohe Urokinase-Aktivität korreliert mit einem geringeren Überleben bei Brustkrebs (Lampeli *et al.*, 2015; Rouch *et al.*, 2016).

Neben dem klinischen Aspekt, wird u-PA häufig bei Fragen nach proteolytischer Aktivität in Westernblots eingesetzt.

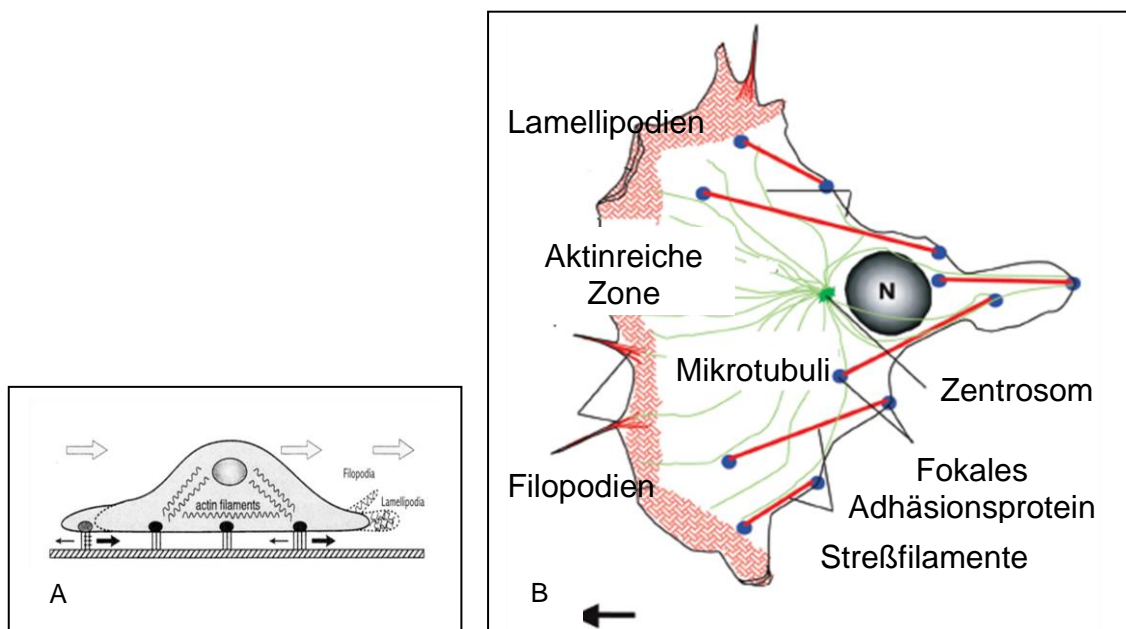


Abb. 7: Schematische Darstellung von aktininduzierter Migration (A) sowie von Filo- und Lamellipodien (B) nach Etienne-Manneville *et al.*, 2004 und Lauffenburger *et al.*, 1996

1.4 Fragestellung

Janulis und Kollegen hatten immortalisierte Mausfibroblasten (NIH-3T3 Zellen) auf ihr Verhalten einer Urokinase-Expression (u-PA) unter konstitutionell hoch-reguliertem Ras-/MAPK ERK/JNK Signalweg untersucht (Janulis *et al.*, 1999). Im Ergebnis war eine durch Ras-/MAPK ERK vermittelte Expression an Urokinase und Cathepsin in Mausfibroblasten nachgewiesen worden. Für die MAPK JNK zeigte sich dieser Zusammenhang nicht und für die p38-Isoformen war der Sachverhalt noch nicht geklärt.

Die Dissertation widmete sich die Frage, ob in immortalisierten Mausfibroblasten eine Ras-/p38 MAPK vermittelte Urokinase-Expression erfolgt und ob diese mit einer bestimmten p38 Isoform korreliert werden kann. Ergänzend sollte in *in-vitro*-Invasionsassays das assoziierte Invasionsverhalten untersucht werden.

2.0 Material und Methoden

2.1 Zell-Linien zur Analyse der Ras-/MAPK-Signaltransduktion

2.1.1 Nicht transfizierter NIH-3T3 Klon

Bei den verwendeten NIH-3T3-Zellen handelte es sich um Mausfibroblasten (von ATCC, Molsheim, Frankreich). Sie dienten einerseits mit ihrer nativen Ras-Aktivität als Negativkontrolle bei Invasionsassays und andererseits als Substrat für transiente Transfektionen. Sie wurden in Medium aus „McCoy's 5A Modified Medium“ mit einem Zusatz von 5 ml Ab/Am sowie 50 ml „fetal calf serum“ inkubiert. Als Transfektionsmedium wurde zusatzfreies Medium verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂ Zusatz in Kultur gehalten.

2.1.2 Stabil Ras-transfizierter NIH-3T3 Klon

Bei den stabil mit EJ vH-Ras transfizierten NIH-3T3-Zellen (Dr. Matthias Simon, Universitätsklinik Bonn) war die Aktivität von H-Ras konstitutiv hochreguliert. Sie wurden inkubiert in „Dulbeccos Mod Eagle Medium“ mit einem Zusatz von 5ml Ab/Am sowie 50 ml FCS. Das Transfektionsmedium entsprach zusatzfreiem Medium. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂ Zusatz in Kultur gehalten.

2.2 Handhabung der Mausfibroblasten

2.2.1 Mausfibroblasten in Kultur nehmen

Die aufgetaute Zellsuspension wurde mit dem zellspezifischen Medium auf ca. 10ml aufgefüllt, durchmischt und in eine Petrischale überführt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um überschüssiges DMSO zu entfernen. Nach Ausbildung eines Zellrasens wurden die trypsinisierten Zellen in Kulturflaschen überführt.

2.2.2 Einfrieren der Mausfibroblasten

Nach Abzentrifugieren wurden die Zellen in frischem zellspezifischem Medium re-suspendiert und anschließend mit einer Gabe von 500µl DMSO versetzt und bei -80 Grad Celsius eingefroren

2.2.3 Splitting und Auszählen der Mausfibroblasten

Bei konfluiertem Zellrasen wurde der Mediumüberstand abgesaugt und verworfen. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit Trypsin gewaschen, um die Bodenadhäsion der Zellen aufzuheben und restliches FBS zur Neutralisierung von Trypsin auszuwaschen. Die im Trypsin- und Mediumgemisch suspendierten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 3500U/min über 5 Minuten abzentrifugiert. Nach Absaugen des über dem Zellbodensatz überstehenden Mediums war dieses bis auf zu einem Volumen von 10ml durch frisches zu ersetzen. Nach letztmaliger Resuspension der Zellen wurden ca. 100µl in eine neue Kulturflasche überführt, in die zuvor 25ml des zellspezifischen Mediums pipettiert worden war.

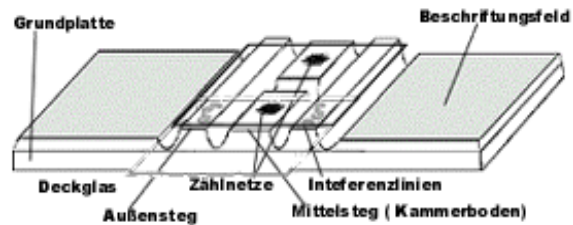
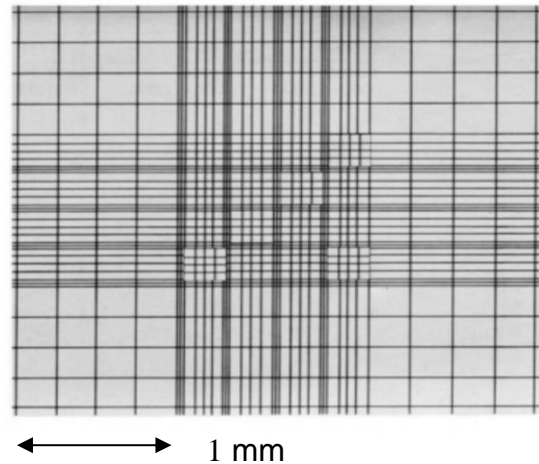


Abb. 8: Zählkammer Neubauer improved mit zwei Zählgittern (oben) und Großaufnahme (unten)

Nach Absaugen des über dem Zellbodensatz überstehenden Mediums war dieses bis auf zu einem Volumen von 10ml durch frisches zu ersetzen. Nach letztmaliger Resuspension der Zellen wurden ca. 100µl in eine neue Kulturflasche überführt, in die zuvor 25ml des zellspezifischen Mediums pipettiert worden war.



Bei Ausplätieren (Aussaat) definierter Zellzahlen wurde die Zählkammer (Neubauer improved, 2 Zählnetze, beispielhaft Abb. 8) mit 10µl der Zellsuspension beschickt und ausgezählt. Der jeweilige Verdünnungsfaktor wurde dabei berücksichtigt.

2.2.4 Zell-Lysierung zur Gewinnung der Ras-/MAPK-Signalproteine

Für die Proteingewinnung fand der aus 10 ml RIPA-Puffer, 10µl Aprotinin und 20µl Pepstadin A bestehende Lysatpuffer Verwendung. Nach Absaugen des Mediums aus der Petrischale und nach einmaligem Waschen mit PBS wurde auf den Zellrasen 1ml des Lysatpuffers pipettiert und anschließend 30Minuten im Kühlschrank inkubiert. Sodann wurden die Zellen mittels eines Zellschabers abgelöst; das so erhaltene Zell-Lysate wurde für 10 Minuten bei 14.000rpm

abzentrifugiert. Der Überstand enthielt das Proteingemisch und wurde für alle weiteren Versuche genutzt.

2.2.5 Analyse der Konzentration von Ras-/MAPK-Signalproteinen

Die Proteinbestimmung der Proben wurde nach der TPRO-562 Prozedur von Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit einer Mischung aus Bicinchoninc Acid Solution und Kupfer (II)-Sulfat Pentahydrat

im Verhältnis 55:1 durchgeführt. Dieser Mischung wurde Protein im Verhältnis 1:100 zugeführt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37⁰ Celsius folgte eine photometrische Auswertung des Substrates bei 570nm im Quantitativtest gegen eine Standardgerade.

2.2.6 Proteinkonzentration der RAS-/MAPK-Signalproteine

Zur Anreicherung des Proteingehaltes in den Proben wurden die Zell-Lysate in Zentrifugenröhrchen (überführt und durch 25 Minuten Zentrifugation bei 5000g aufkonzentriert.

2.3 Transfektionen von NIH-3T3-Mausfibroblasten zur Analyse des Ras-/MAPK-Signalweges

2.3.1 Transiente Transfektion von NIH-3T3-Mausfibroblasten zur Analyse des Ras-/MAPK-Signalweges

Als Versuchsanordnung wurden Fibroblasten in sechs verschiedenen Variationen transient transfiziert. Dazu zählten die vier negativen Isoform-Mutanten p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ , H-Ras sowie als Leervektoren zur Kontrolle pcDNA₃ gemeinsam mit pSV_{2neo}.

Tab. 3: Transfektionsplan für den u-PA-Cat-Promoter Versuch

Ansatz	1.	2.	Kontrolle
p38 α (μ g)	0,1	1,0	0
p38 β (μ g)	0,1	1,0	0
p38 γ (μ g)	0,1	1,0	0
p38 δ (μ g)	0,1	1,0	0
H - Ras (μ g)	5,0	5,0	0
pcDNA ₃ (μ g)	0,9	0	1,0
pSV _{2neo} (μ g)	0	0	4,0
u-PA Konstrukt (μ g)	3	3	3
Total (μ g)	9	9	8
Lipofectamin (μ l)	27	27	24

Tab. 2: Transfektionsplan für transient mit p38 Isoform-Mutanten transfizierte NIH-3T3 Zellen. pSV₂neo ist der Leervektor für H-Ras

	1	2	3	4	5	6
p38 α ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) μg μl	1,75 4 2,28					
p38 β ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) μg μl		1,805 4 2,22				
p38 γ ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) μg μl			1,335 4 3,0			
p38 δ ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) μg μl				1,59 4 2,52		
H - Ras ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) μg μl	0,5 4 8,0	0,5 4 8,0	0,5 4 8,0	0,5 4 8,0	0,5 4 8,0	
pcDNA ₃ ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) μg μl					1,54 4 2,60	1,54 4 2,60
pSV ₂ neo ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) μg μl						0,495 4 8,6
GFP ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) μg μl	1,465 1,5 1,03	1,465 1,5 1,03	1,465 1,5 1,03	1,465 1,5 1,03	1,465 1,5 1,03	1,465 1,5 1,03
Total (μg)	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
Lipofectamin (μl)	28,5	28,5	28,5	28,5	28,5	28,5

Bei den Negativmutanten handelte es sich um Proteine ohne aktivierbare Domäne mit der Struktur von p38-Isoformen. Nach Kotransfektion mit der H-Ras-Mutante, lassen sich Rückschlüsse über Bedeutung der einzelnen p38-Isoformen für das Invasionsverhalten der Zellen ziehen. Als Kontrolle wurden die gleichen Zelllinien mit den Leervektoren für H-Ras (pSV₂neo) und p38 (pcDNA₃) kotransfiziert, um die basale Invasionsaktivität ohne Beeinflussung durch die eingesetzten codierten Vektoren darzustellen.

Für die transiente Transfektion wurde Lipofectamin und DNA im Verhältnis 3:1 (Transfektionsplan siehe Tab. 2) eingesetzt. Dafür wurden NIH-3T3 Zellen am Vortag der Transfektion je 300.000 Zellen ausplattiert. Lipofectamin (und die

einzusetzende DNS-Menge wurden in je 100µl serumfreies Medium (SFM) überführt und über 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit 800µl SFM aufgefüllt, wurde dieser Transfektionsansatz auf die zuvor zweifach mit SFM gewaschenen Zellen pipettiert und nach einer fünfstündigen Inkubationszeit durch 2 ml 10% FBS-haltiges Zellkulturmedium ersetzt und für weitere 48h Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.3.2 Stabile Transfektion von NIH-3T3-Mausfibroblasten zur Analyse des Ras/-MAPK-Signalweges

Bei stabilen Transfektionen (siehe Tab. 3) wurde analog zu den transienten verfahren. Darüber hinaus folgte die Inkubation jedoch in Selektionsmedium mit Geneticin (G 418 Sigma-Aldrich). Anschließend wurden einzelne Zellnester mit „Cloning Zylinder“ (Sigma-Aldrich) isoliert, nach Waschen mit PBS und mit Trypsin gelöst sowie in jeweils eine neue Petrischale mit Selektionsmedium überführt. Wiederum wurden angewachsene Zellnester wie beschrieben isoliert und überführt. Da die Lebensdauer transient transfizierter Zellen ohne Selektionsdruck bereits auf ca. 100 Stunden begrenzt ist, selektierten sich über mehrere Passagen hinweg stabile Klone.

2.4 Plasmide und Vektoren zur Transfektion von NIH-3T3-Zellen

2.4.1 Verwendete Plasmide zur Transfektion von NIH-3T3-Zellen

Plasmide sind ringförmige, extrazelluläre DNS oder RNS Basenstränge, die co-dierte Eigenschaften unter einer Spezies sowie verschiedenen Speziesgruppen in Pro- und Eukaryonten in die DNS des Wirtorganismus integrieren können. Neben retroviralen Vektoren gibt es Phagozytose-basierte Transfektionen und die Lipofektion (Felgner et al., 1987; Loyter et al., 1982; Cone and Mulligan, 1984). Die Transfektionen erfolgten mit Lipofectamin.

Tab. 4: Übersicht über verwendete Konstrukte und Vektoren sowie deren Bezugsquelle

	<u>Mutation / Protein</u>	<u>Leervektor</u>	<u>Bezugsquelle</u>	<u>Literatur</u>
EJH-Ras	Austausch von Glycin gegen Valin auf Codon 12	pSV _{2neo}	Dr. Tainsky (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX)	(Nicolson <i>et al.</i> , 1990)
p38-Isoform Negativmutanten	Dominante Negativmutante durch Austausch von Thre gegen Ala und Tyr gegen Phe an Phosphorylierungsmotiven (entspr. TGY Sequenz)	pcDNA ₃	Dr. Han (Scripps Research Institute, La Jolla, CA)	(Jiang <i>et al.</i> , 1996 ; Huang <i>et al.</i> , 2000; Li <i>et al.</i> , 1996; Wang <i>et al.</i> , 2000)
u-PA-Cat-Promotor (Fremdleistung)	CAT	PSV ₀	Dr. Blasi (University of Milan, Italy)	(Nerlov <i>et al.</i> , 1992; Sidenius <i>et al.</i> , 2003)
GFP Protein	Green fluorescent protein	pcDNA ₃	Dr. Lauer (University of Tuebingen, Germany)	(Wybranietz <i>et al.</i> , 1999)

2.4.2 Verwendete Vektoren zur Transfektion von NIH-3T3-Zellen

Vektoren definieren sich als transmembranäres Transportvehikel der fremden Nucleinsäuren. Neben Plasmiden fallen Viren, Bakteriophagen, oder Cosmide (λ -Phage mit zwei cos-sites) und BAC's, YAC's, oder HAEC's (Vorteil: große Abschnitte von Fremd DNS bis 300kb transfizierbar) unter die Vektordefinition (Zhang *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 1983; Shizuya *et al.*, 1992; Ioannou *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1994).

Die als Negativmutanten und Reporter codierten Konstrukte sowie die eingesetzten Vektoren wurden käuflich erworben und sind in Tabelle 4 aufgeführt.

2.5 Immunoblot zur Analyse des Ras-/MAPK-Signalweges

2.5.1 Immunoblot

Die Proben wurden auf ihren Proteingehalt normalisiert und zu gleichen Anteilen mit 2-fachem Laemmli Puffer versetzt, 45 Sekunden aufgekocht, abzentrifugiert und auf 10%iges SDS Gel aufgetragen.

2.5.2 Verwendete Puffer

Als Lysepuffer wurde der RIPA Puffer (50mM Tris HCL mit pH 7,4, 1% NP₄O 40%, 0,25% NaDoc, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF) verwendet, ferner der Transferpuffer (25mM Tris (pH 6,8), 0,2M Glycin, 80% dH₂O, 20% Methanol, vor Gebrauch auf 4⁰ Celsius abkühlen), Elektrophoresepuffer (0,2M Glycin, 25mM Tris in d H₂O) sowie als Blockpuffer PBS (80% NaCl, 15% Na₂HPO₄, 2% KCl, 3% KH₂PO₄, zu lösen in zweifach destilliertem H₂O, anschließend zu autoklavieren).

2.5.3 Herstellung von Acrylamidgel

Verwendung fanden zwei Acrylamidgele: Das Sammelgel (3,48ml Acrylamid (30%, Bio-Rad), 3,6ml dH₂O, 2,5ml Tris 100µl SDS, 100µl APS (Ammoniumpersulfat, 10%), 10 µl TEMED (Fluka Biochemika) und das Trenngel (1,32ml Acrylamid (30%), 6ml dH₂O, 2,5ml Tris (0,5 M, pH 6,8), 100µl SDS (Moreira-Carboni *et al.*, 2015), 27µl APS (Moreira-Carboni *et al.*, 2015), 9µl TEMED).

Die Gele wurden in die vorbereiteten Blotkammern gegossen.

Durch einen eingesetzten Kamm entstanden nach Aushärten Probenaschen. Die Gele polymerisierten abhängig von der Umgebungstemperatur nach bis zu 30 Minuten aus.

2.5.4 Durchführung der Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte über 1 Stunde bei 150 Volt, der Proteintransfer auf die PVDF Membran bei 100 Volt über 45 Minuten. Zum Transfer der Proteine wurde das Acrylamidgel auf eine Methanol- und Transferpuffer-exponierte Nitrocellulosemembran luftblasenfrei aufgelegt und mit transferpuffergetränktem Filterpapier zu jeder Seite gegen die Anoden-respektive Kathodenmembran abgedeckt.

2.5.5 Western Blot zum Nachweis von Urokinase in NIH-3T3-Zellen

Nach erfolgter Auftrennung des Proteingemisches und dem Transfer auf die PDVF Membran wurde diese in 5%igem PBST für 12h bei 4°C inkubiert. Der primäre Antikörper („goat polyclonal IgM antibody“, Santa Cruz Biotechnology) wurde in einer Verdünnung von 1:500 zugegeben und nach 12h durch wiederholtes Waschen mit PBST entfernt. Nach Inkubation mit dem sekundären AK („antimouse polyclonal IgG antibody“, Santa Cruz Biotechnology Antikörper) über 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden die Proteinbanden mittels ECL (Amersham) nach Herstellerangaben visualisiert.

2.5.6 Western Blot zum Nachweis von p38 in NIH-3T3-Zellen

Verfahren wie beschrieben mit primärer p38 Antikörperinkubation („goat polyclonal IgG“, Santa Cruz Biotechnology, Katalognummer: sc-535-G) 1:500 und weiterer Exposition mit dem sekundären Antikörper mit einer Verdünnung von 1:5000 über 1 Stunde. Visualisierung mittels ECL-System.

2.5.7 Immunopräzipitation von p38 in NIH-3T3-Zellen

Im Unterschied zum Western Blot wurde bei der Immunopräzipitation als vorgeschalteter Schritt in der eingesetzten Probe das zu untersuchende Protein mit Antikörpern über einen definierten Zeitraum inkubiert. Die über ihre Antigen-domäne an den phosphorylierten Anteil des aktivierten Proteins gebundenen Antikörper wurden durch zeitgleiche Exposition mit 30 µl Protein-G-Agarose (Roche) an diese mit ihrem F_c-Teil gebunden, und als Komplex aus Zielprotein, gebundenem Antikörper sowie Agarose ausgefällt. Nach diesem Schritt folgte ein Western-Blot (siehe oben).

Aktivität des Proteins p38: phosphoryliertes p38-Protein (pp38)

Die Immunopräzipitation mit p38 Antikörpern („goat polyclonal IgG“, Santa Cruz, Katalognummer: sc-535-G) erfolgte bei 4⁰ Celsius über Nacht, Blockpuffer in 4%igem Milchpulver in Kombination mit PBST über 1 Stunde bei 4⁰ Celsius, pp38 Antikörper („mouse monoclonal IgM antibody“, Santa Cruz Biotechnology, Katalognummer sc-7973 (1:200)), über Nacht bei 4⁰ Celsius, anschließend sekundärer Antikörper (1:5000) über 1 Stunde. Visualisierung via ECL-System.

2.5.8 Immunopräzipitation von Ras in NIH-3T3-Zellen

Die Bestimmung erfolgte mittels Ras-Analyse-Kit und erforderte eine andere Acrylamidkonzentration für die Immunopräzipitation: Um eine optimale elektrophoretische Auftrennung zu gewährleisten, enthielt das Trenngel eine höhere Acrylamidkonzentration (Wybranietz *et al.*, 1999), um den Proteinkomplex durch ein dichteres Acrylamidnetzwerk durch modifizierte Elektrophoresewanderung optimal darzustellen.

Das Ras-Assay wurde gemäß der Anleitung (des „Ras Activation Assay Kit“ (Upstate Biotechnology) durchgeführt: Nach Lyse mit 5xMLB (RAS Assay Kit: 125mM HEPES mit pH 7,5, 750mM NaCl, 5 % Igepal CA - 630, 50mM MgCl₂, 5mM EDTA, 10% Glycerol) und Präzipitation mit 5µg Raf-1 RBD Agarose wurde der Komplex aus Ras-GTP und RAF-RBD-Agarose („agarose beads“) nach zweimaligem Waschen mit Laemmli Puffer über 2 Stunden bei 25⁰ Celsius mit PBS geblockt. Anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper (1:500) über Nacht bei 4⁰ Celsius sowie mit dem sekundären Antikörper (1:3000) über 2,5 Stunden bei Raumtemperatur. Nach erfolgter SDS Gelelektrophorese erfolgte die Proteinvisualisierung mit Hilfe des ECL-Systems. Belichtet wurde zwischen 0,5-4 Minuten.

2.6 *In-vitro*-Invasionsassay zur Analyse der invadierten NIH-3T3-Zellen

Mit den bisher aufgeführten Methoden war es nicht möglich, den biologischen Effekt von Ras und p38 vermittelter Invasionshemmung nachzuweisen.

Diese biologische Auswirkung des beeinflussten Ras-/MAPK-Signalweges musste durch Invasionsassays in Form der unterschiedlichen Infiltrationskapazität der Zellen nachgewiesen werden. Die Invasions- bzw. Boydenkammern (Abb. 9) sowie das

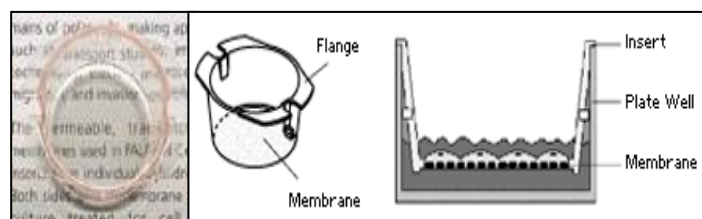


Abb. 9: Boydenkammer mit Invasionskammer (Chipperfield *et al.*, 1985), Porenmembran (Membrane) und Vertiefung für die Invasionskammer (Plate Well)

Matrigel stammten von Becton Dickenson™. Die Auswertung der Invasionsversuche erfolgte mittels MTT-Test, die mikroskopische Auszählung der transient

transfizierten NIH-3T3-Zellen in der Boydenkammer erfolgte mit einem konfokalen Laserscanmikroskop (LSM).

2.6.1 Funktionsprinzip

NIH-3T3-Zellen wurden in Boydenkammern auf Matrigel in definierter Zellzahl gekühlt ausplattiert, da das Matrigel bei Raumtemperatur polymerisiert. Diese Invasionskammern verfügen über eine Membran, die eine Vielzahl an Poren von 8 µm Durchmesser aufweisen.

Anschließende Inkubation der Boydenkammern erfolgte über 60 Stunden im Brutschrank bei 37° Celsius und 5% CO₂-Anteil.

Die Verdünnung und die Menge des eingesetzten Matrigels sowie die Inkubationszeit des Ansatzes sind neben der biologischen Fähigkeit der Zelle weitere konditionell beeinflussbare Größen auf das Invasionsverhalten. Spezifische Versuchsbedingungen der beiden unterschiedlichen Invasionsassay-Ansätze werden unter den verschiedenen Auswertungen abgehandelt.

2.6.2 Auswertung der Invasionsaktivität von NIH-3Z3-Zellen mittels MTT-Test

Die Auswertung erfolgte mittels des MTT (=3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromide) Tests und mithilfe eines Laserscanmikroskops. Der MTT-Test beruht auf der Eigenschaft, dass vitale Zellen mit intakter Atmungskette durch ihre Mitochondrien-Dehydrogenasen das Tetrazoliumsalz MTT reduzieren und in einen photometrisch bei 570nm nachweisbaren, wasserunlöslichen MTT-Formazankomplex überführen, der in DMSO löslich ist.

Auf eine je nach Versuch variierend mit bis zu 50 µl Matrigel beschichtete Porenmembran eines „Control-Inserts“ wurden je Ansatz bis zu 100.000 stabil mit EJ vH-Ras transfizierte oder nicht-transfizierte Fibroblasten ausplattiert mit einer Matrigelmenge von 50µl bei einem Verdünnungsfaktor von 1:20 nachfolgend 18,5 Stunden unter Brutschrankbedingungen inkubiert.

Zur gezielten Beeinflussung des Ras-/MAP-Kinasenweges konnte mit SB 203580 (Calbiochem) einem spezifischen Hemmstoff von p38 α und p38 β , sowie mit SB 202474 (Negativkontrolle: Calbiochem) ein verändertes Invasionsverhalten der Zellen beobachtet werden.

Anschließend folgte eine Auswertung der Zellverteilung im unteren sowie oberen Kompartiment des „well-plates“ mittels MTT-Test (Sigma-Aldrich, 5 mg/ml).

Hierfür wurde in PBS gelöstes MTT (5mg/ml) 1:10 mit NIH-3T3-Medium verdünnt. Nach Absaugen des Mediums wurden in das Korbchen 500 µl und in das „well“ 1000 µl der MTT-Lösung pipettiert und über 45 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend wieder entfernt. Der Anteil der nicht invadierten Zellen wurde gemeinsam mit dem Matrigel mit Wattestäbchen aufgenommen und in eine 1000 µl DMSO enthaltende Küvette überführt. Mit der Porenmembran der Boydenkammer wurde nach Heraustrennen mit einem Skalpell gleichermaßen verfahren.

Photometrisch wurden die Ansätze nach Durchmischen (vortexen) bei 570nm gegen DMSO als Leerwert gemessen und die Zellen unterhalb der Membran als Prozentsatz der Gesamtzellmenge angegeben.

2.6.3 Auswertung der Invasionsaktivität von NIH-3T3-Zellen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie

Das konfokale Laserscanmikroskop ist ein Lichtmikroskop, das mit einem Laser- und Scannermodul gekoppelt ist.

Durch seine konfokale Eigenschaft sowie die Verarbeitungssoftware bietet es die Möglichkeit, Proben dreidimensional auszuwerten. Dieses Merkmal beruht auf der Fähigkeit, nicht nur eine Fläche in der X- und Y-Achse darzustellen, sondern zusätzlich über eine Reduktion der Lichtreflexion auch aus darüber- und darunterliegenden Schichten auf eine Schnittebene fokussieren zu können. Aufnahmen in der vertikalen Achse (Z-Achse) werden als Z-Scan bezeichnet.

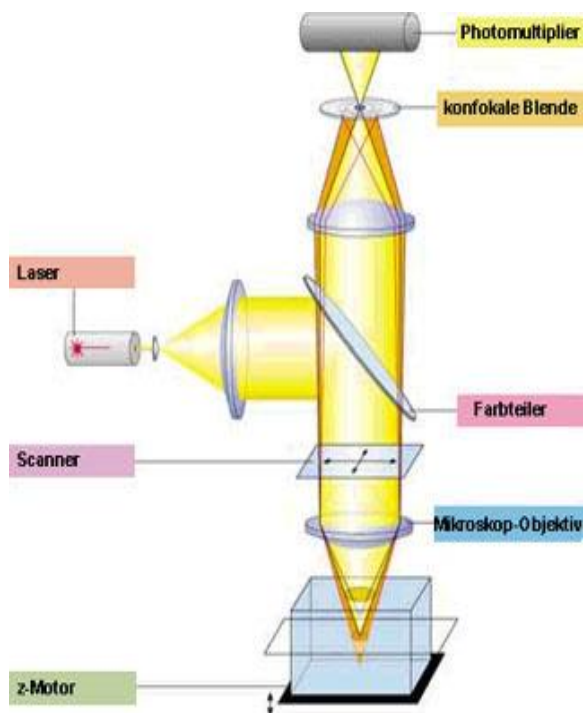


Abb. 9: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines konfokalen LSM nach dem Onlinemanual von Zeiss

Die Invasionsversuche anhand der hier vorgenommenen Zellauszählung auszuwerten, ist zwar zeitintensiv, gleichwohl aber wegen weitaus größerer Genauigkeit dem MTT-Nachweisverfahren überlegen.

Für die Auswertung der Invasionsassays stellte das Anatomische Institut der Universität Tübingen das Laserscanmikroskop 410 von Zeiss zur Verfügung (Abb. 9).

Fibroblasten wurden transient mit EJ cH-Ras (in Codonposition 12 war das Glycin durch Valin ersetzt) und dominanten p38 Isoform-Negativmutanten sowie den entsprechenden Leervektoren für die Kontrolle transfiziert. Da bei transients Transfektion die Transfektionseffizienz lediglich zwischen 5-10% liegt, wurden die Zellen zusätzlich mit Grün-fluoreszierendem Protein kotransfiziert, um bei der Auswertung unter dem Laserscanmikroskop transfizierte Zellen identifizieren zu können. Nach der Transfektion wurden die Zellen im Brutschrank über 60 Stunden inkubiert. Vor Aussaat der Zellen (50.000 je Ansatz) wurde die Membran des „Control Inserts“ mit 5 µl Matrigel (Verdünnung 1:5) zwecks Porenverschluss beschichtet und über eine Stunde unter Brutschrankbedingungen inkubiert, nach Aussaat weitere 24 Stunden.

Im Anschluss an die Inkubationszeit verblieben die unterschiedlichen Ansätze zum Auszählen in ihrer Boydenkammer im Inkubationsmedium. Um standardisiert auszählen zu können, wurde die Kammer auf dem Objektisch im durchfallenden Lichtstrahl zentriert und 100 Quadrate je oberhalb und unterhalb der Porenmembran ausgezählt (Abb. 10). Die sich in diesen Quadraten befindenden Zellen wurden sowohl oberhalb wie auch unterhalb der Porenmembran ausgezählt und in einen prozentualen Infiltrationswert umgerechnet worden.

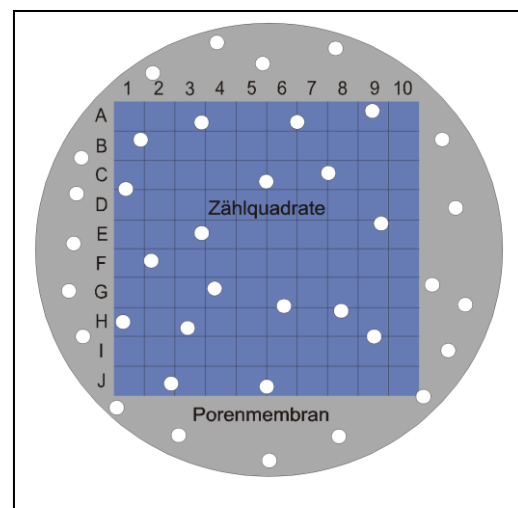


Abb. 10: Auszählung der Zellen in zwei Ebenen oberhalb und unterhalb der Porenmembran, jeweils 100 Quadrate

Durch transiente Transfektion der Mausfibroblasten mit H-Ras als Positivkontrolle und der Kotransfektion mit den p38 Isoform Negativmutanten ergab sich eine differenzierte Aussage über die jeweilige Isoform assoziierte, invasionshemmende Komponente. Dieser Versuch wurde in gleicher Konstellation zweimal durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte nicht über den MTT-Test, da die mikroskopische Auszählung invadierter sowie nicht invadierter Zellen eine präzisere Auswertung ermöglichte. Die Zuordnung transfizierter NIH-3T3 und nicht transfizierter wurde durch Kotransfektion mit GFP gewährleistet: Nur erfolgreich mit GFP kotransfizierte Zellen wurden in die Auswertung mit einbezogen.

3.0 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Verfahrens zur Detektion der Ras-/p38- Signalkaskade in immortalisierten NIH-3T3-Zellen (Mausfibroblasten)

Stand der Forschung zu Beginn der Arbeit war, dass Ras-abhängige Tumordinvasionsprozesse in immortalisierten Mausfibroblasten (Zhao *et al.*, 2016) über eine ERK-vermittelte Expression von Urokinase und Cathepsin ausgelöst werden (Janulis *et al.*, 1999). Es war unklar, ob dieser über eine p38 Signalkaskade vermittelt wird.

Um eine Ras-/p38-assoziierte Signaltransduktion zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Studie immortalisierte Mausfibroblasten-Linien herangezogen, die bereits in unserer Arbeitsgruppe für stabile Transfektionen mit H-Ras sowie transiente Transfektionen mit H-Ras und p38 Isoform-Negativmutanten generiert worden waren (Simon *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Invasionspotenz von immortalisierten Mausfibroblasten über eine Signalkaskade vermittelt wird, die eine vermehrte Urokinase-Aktivität während des Invasionsprozesses der Zellen mit einschließt. Diese neuen Erkenntnisse wurden 2005 veröffentlicht (Behren, Binder *et al.*, *Experimental Cell Research*, 303 (2005) 321–330).

3.1.1 Analyse der Rolle von p38 für das Invasionsverhalten von immortalisierten NIH-3T3 Zell-Linien

Primär sollte der Zusammenhang zwischen dem Ras-Protein, und der nachgeschalteten p38-MAPK-Signalkette auf die Tumordinvasion geprüft werden. Explizit galt es hierbei auch zu klären, inwieweit eine Urokinase-Aktivität bei der Invasion von Tumorzellen, über Ras- und p38- vermittelt, eine Rolle spielt.

Um die nachfolgenden Ergebnisse übersichtlich einzuordnen, sind die Analysen nach biologischem und methodischem Aspekt in Abbildung 11 aufgeführt.

Es konnte auf eine Zell-Linie zurückgegriffen werden (NIH-3T3 von ATCC), die nicht transfiziert als Kontrolle dienten (Negativkontrolle) und nach transienter oder stabiler H-Ras-Transfektion als Positivkontrolle verwendet werden konnten und bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert waren (Simon *et al.*, 2001).

Fibroblasten wurden hierzu kultiviert und präpariert, wie unter Material und Methoden beschrieben. Anhand von Western Blots erfolgte der Nachweis der Kaskadenproteine mit Hilfe der Immunopräzipitation. Hierbei wurden explizit solche Proteine präzipitiert, die durch Phosphorylierung nach Stimulation aktiviert wurden.

Darüber hinaus wurde proteolytisches Korrelat im Western Blot eine Urokinase-Expression nachgewiesen. Diese Spezifität wurde unter Hemmung der Isoform p38 α validiert.

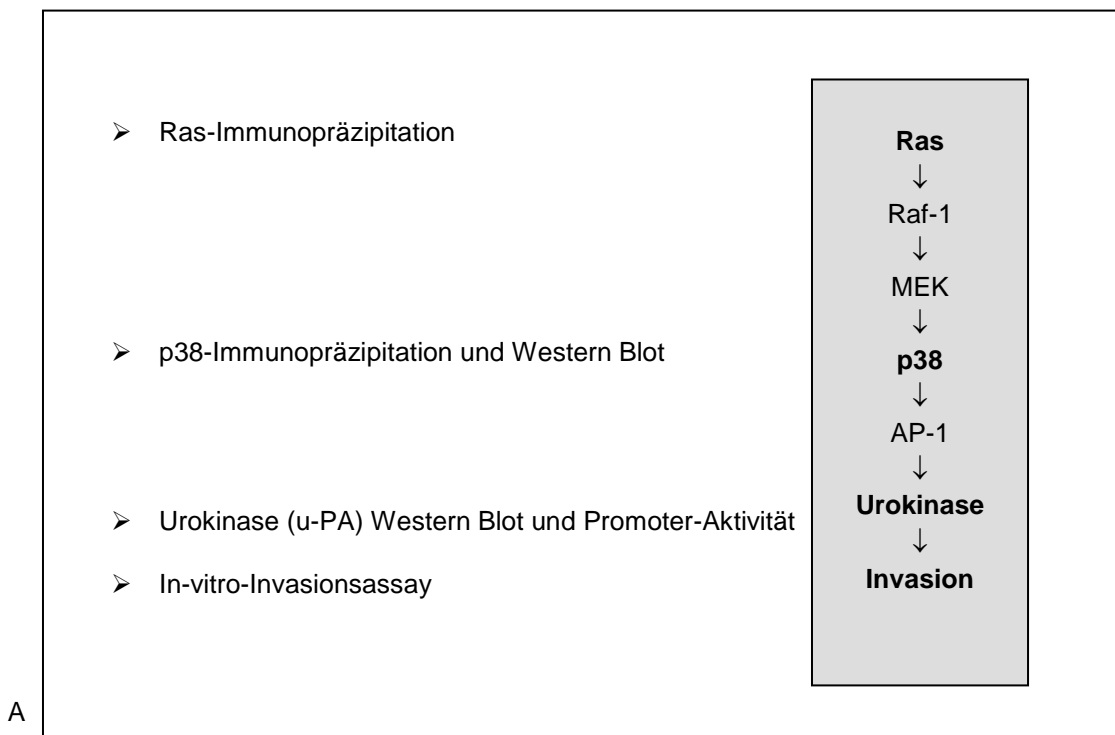
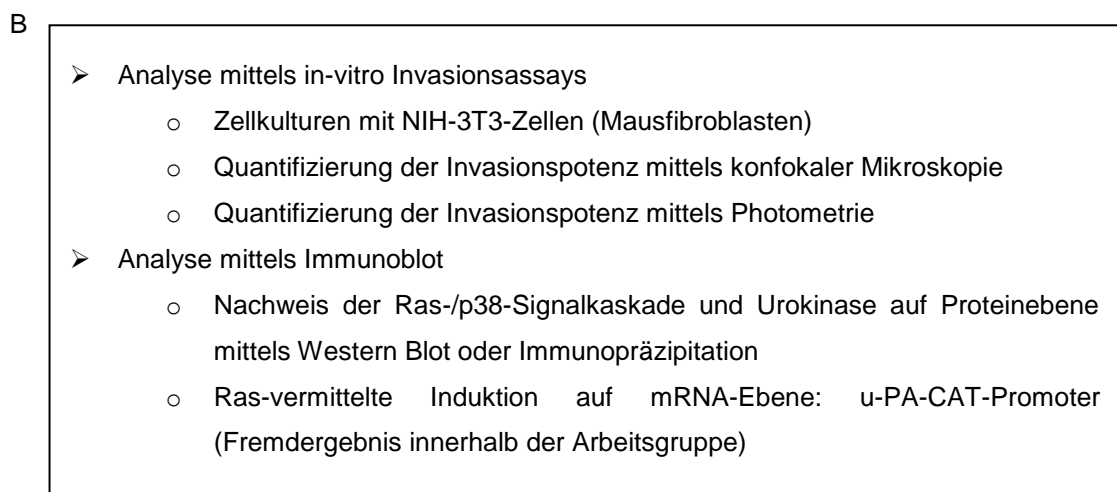


Abb. 11: Analysenübersicht zum Nachweis der Ras- und p38-abhängigen Induktion von Tumorinvasion unter biologischem (A) und methodischem (B) Aspekt, Begriffserklärungen sind im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt



Ergänzend erfolgte der Nachweis einer Ras-assoziierten Induktion einer u-PA-CAT-Promoter-Aktivität durch unsere Arbeitsgruppe, die erhobenen Untersuchungsergebnisse wurden mir zur Verfügung gestellt.

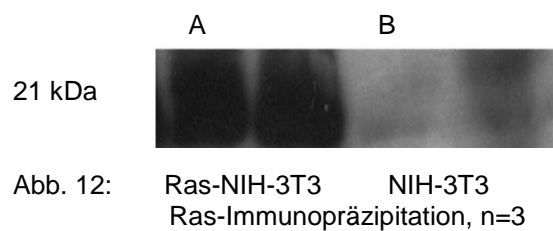
Der biologische Endpunkt einer möglichen vermehrten Invasionsrate wurde mit in-vitro-Invasionsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, überprüft.

In Folge sind die einzelnen Ergebnisse einer Ras-/p38-vermittelten Invasionspotenz in immortalisierten Mausfibroblasten durch Immunoblots und in-vitro-Invasionsassays dargestellt.

3.2 Analyse des Ras-/p38-vermittelten Signalweges in immortalisierten NIH-3T3-Zellen

3.2.1 Analyse der Ras-/p38-Signalkaskade mittels Ras-Immunopräzipitation

Wesentliche Voraussetzung für die Fragestellung Ras-abhängiger Invasionsprozesse war ein Nachweis der induzierbaren Ras Aktivität in NIH-3T3 Zellen. Um eine vergleichende Aussage über vorliegendes phosphoryliertes Ras-Protein in normalen wie transfizierten Zellpopulationen treffen zu können, wurden stabil H-Ras transfi-



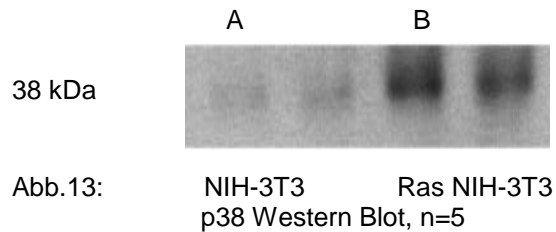
zierte Klone und nicht transfizierte Klone auf das Ras-/GTP Protein untersucht. Die Expression von Ras wurde mit Hilfe eines Antikörpers im Western Blot Verfahren, wie in Material und Methoden beschrieben, nachgewiesen. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt. Eine Quantifizierung des Bandensignals wurde nicht durchgeführt.

Wie in Abbildung 12 exemplarisch abgebildet, fällt nach Transfektion das Signal des aktivierten Ras-Proteins in den mit H-Ras transfizierten Mausfibroblasten (Abb. 12 A) im Vergleich zu dem nicht transfizierten Klon (Abb. 12 B) deutlich stärker aus.

Zusammenfassend zeigte der mit Ras transfizierte Klon im Vergleich zu den nicht transfizierten Fibroblasten eine visuell erhöhte Banden-Aktivität des phosphorylierten Ras-Proteins an.

3.2.2 Analyse der Ras-/p38-Signalkaskade mittels p38 Western Blot

Zur Analyse der Ras-abhängigen und p38-vermittelten Signalkette, wurden nicht transfizierte sowie stabil H-Ras transfizierte Fibroblasten mit Hilfe von Immunoblots auf



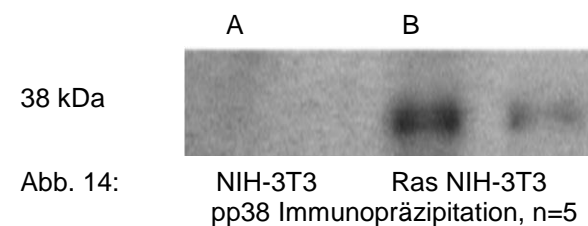
die Expression von inaktivierten nicht phosphorylierten MAPK 38 hin untersucht, wie im Material- und Methodenteil beschrieben. Der Versuch wurde 5-mal durchgeführt, eine Quantifizierung des Bandensignals erfolgte nicht. Abbildung 13 zeigt exemplarisch die vergleichende Bande zwischen dem p38 Signal der nicht mit H-Ras transfizierten Mausfibroblasten und dem transfizierten Klon.

Im Ergebnis konnte der Nachweis erbracht werden, dass die nicht aktivierte MAPK 38 (p38) in beiden Klonen exprimiert wird. Auffallend waren dabei die im nicht transfizierten Klon (Abb. 13 A) geringer ausfallenden MAPK 38 Signal als diejenigen, die im H-Ras-transfizierten Klon (Abb. 13 B) nachweisbar waren.

Es lässt sich postulieren, daß p38 bei den nicht transfizierten Mausfibroblasten und bei dem mit H-Ras transfizierten Klon nachweisbar ist. Allerdings ist das Bandensignal des mit H-Ras transfizierten Klon deutlich stärker ausgebildet.

3.2.3 Analyse der Ras-/p38-Signalkaskade mittels p38 Immunopräzipitation

Um eine Ras-abhängige Aktivierung der MAPK p38 zu studieren, erfolgte eine Immunopräzipitation. Hiermit galt es, durch Antikörperbindung mit Hilfe von Western-Blots das Ausmaß der nach Aktivierung phosphoryliert vorliegenden pp38-MAPK zu untersuchen. Der Versuch wurde 5 Mal gemäß der Beschreibung im Material- und Methodenteil durchgeführt. Eine Quantifizierung des Bandensignales wurde nicht erhoben. In Abbildung 14 lässt sich exemplarisch nachvollziehen, daß die nicht mit H-



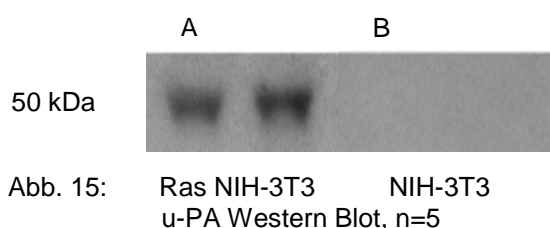
Ras transfizierten Mausfibroblasten (Abb. 14 A) im Vergleich zu den mit H-Ras transfizierten Zellen (Abb. 14 B) ein schwächeres Signal ausbildeten.

Es lässt sich ableiten, daß eine Ras-assoziierte Aktivierung der MAPK p38 in den Ras-transfizierten Mausfibroblasten besteht, die in der Kontrollgruppe des nicht Ras-transfizierten Klons nicht nachgewiesen werden konnte.

3.2.4 Analyse der Ras-/p38-Signalkaskade mittels u-PA Western Blot

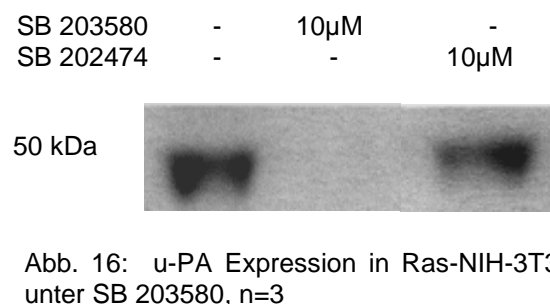
Ziel dieser Analyse war der Nachweis, dass bei ERK-vermittelter Urokinase-Induktion diese auch p38-assoziiert erfolgt. Daher wurden mit H-Ras transfizierte Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten auf ihre Urokinase-Expression untersucht. Die Untersuchung erfolgte gemäß den Angaben im Material- und Methodenteil. Eine Quantifizierung des Bandensignals ist nicht erfolgt.

Im Western Blot wurde mit Hilfe von Antikörpern, wie in Material und Methoden beschrieben, die Urokinase-Expression in mit H-Ras transfizierten und nicht transfizierten NIH 3T3 Zellen untersucht. Hierbei konnte in Abbildung 15, exemplarisch für 5 Untersuchungen, ein Ras-vermittelter Urokinase-Nachweis erbracht werden: So setzt sich die Urokinase-Expression der mit H-Ras transfizierten Fibroblasten (Abb. 15 A) mit starker Signalbande im Vergleich zu den nicht transfizierten Fibroblasten (Abb. 15 B) mit fehlender Signalbande deutlich ab.



In einer weiteren Versuchsanordnung ging es um die Reversibilität der Urokinase-Expression unter Einsatz einer p38 Inhibitors, wie in Material und Methoden beschrieben. Eine Quantifizierung des Bandensignals erfolgte nicht.

In 3 Versuchen konnte gezeigt werden, dass unter der spezifischen Hemmung der MAPK p38 durch das Imidazolderivat SB 203580 die Urokinase-Expression aufgehoben wurde. Dieser Effekt war unter Verwendung der Negativkontrolle SB 202474-einem inaktiven Analogon von SB 203580-reversibel und ist exemplarisch in Abb. 16 dargestellt.



Resultierend besteht zwischen einer Ras-induzierten und p38 vermittelten Urokinase-Expression ein Zusammenhang. Diese Expression ist unter Gabe eines p38-Inhibitors nicht nachweisbar.

3.2.5 Analyse der Ras-vermittelten Induktion des u-PA-CAT-Promoters auf mRNA-Ebene (Fremdergebnis innerhalb der Arbeitsgruppe)

Ergänzend zum Urokinasenachweis im Western Blot auf Ebene des biologischen Effektors der Invasion, wurde in unserem Labor ein Chloramphenicol-Transferase (CAT)-Elisa durchgeführt, mittels dessen geprüft werden sollte, ob die Urokinase-Expression ein spezifisches Ras-abhängiges Korrelat einer Reporter-genaktivierung auf mRNA-Ebene ist.

In der Versuchsanordnung erfolgte eine Transfektion mit Negativmutanten der p38 Isoform, die in Abhängigkeit der transfizierten Konzentration zu einer reduzierten Invasion führten. Demgegenüber wurde der transient mit H-Ras transfizierten NIH-3T3-Klon als Positivkontrolle eingesetzt. Die Fragestellung des Versuches bezog sich auf die potentielle Inhibition der u-PA-CAT-Promoter-Aktivität.

Das Experiment wurde in enger Kooperation mit Herrn Andreas Behren aus unserer Arbeitsgruppe von Herrn Dr. med. Simon durchgeführt. Das Resultat ist in Abbildung 17 exemplarisch für 3 Versuchsdurchführungen dargestellt: Dabei stehen die Balkendiagramme für eine prozentuale Aktivität des u-PA-CAT-Promoters in mit H-Ras (Abb. 17, roter Balken) und mit Negativmutanten der p38-Isoformen

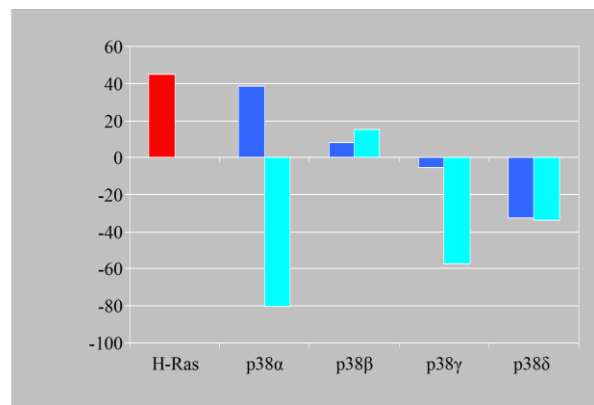


Abb. 17: Nachweis der Induktionshemmung des Ras-/p38-abhängigen u-Pa-CAT Promoters mittels CAT-ELISA, Angabe in Prozent, n=3

transfizierten NIH-3T3-Zellen, die mit einer unterschiedlichen Konzentration transfiziert wurden (Abb. 17: dunkelblauer Balken 0,1µg, hellblauer Balken 1,0µg). Als Kontrolle dienten Leervektoren (pSV₂neo für H-Ras und pcDNA₃ für Negativmutanten der p38-Isoformen), deren fehlender Einfluss auf die u-PA-CAT-Promoter-Aktivität als Nulllinie festgelegt wurde.

Durch die jeweils mit 2 Konzentrationen von p38 Isoform-Negativmutanten angesetzten Transfektionsansätze sollte die Frage bezüglich der dosisabhängigen u-PA-CAT-Promoter-Aktivität beantwortet werden.

Im Ergebnis fiel auf, daß durch den Einsatz der p38 α Isoform-Negativmutante eine ausgeprägte konzentrationsabhängige Hemmung der H-Ras-vermittelten u-PA-Promoter-Aktivität erfolgte (Abb17 dunkelblauer gegen hellblauer Balken).

3.3 Analyse des Ras-/ p38-vermittelten Signalweges in immortalisierten NIH-3T3 Zellen im *in-vitro*-Invasionsassay:

Mit Hilfe der Westernblot-Verfahren wurden der Ras-/p38-Signalweg und die Urokinase auf Proteinebene in mit H-Ras transfizierten und nicht transfizierten Mausfibroblasten untersucht.

Zum Nachweis eines Urokinase-assoziierten *in-vitro* Infiltrationsverhaltens wurden zwei Versuchsbedingungen etabliert: Dabei war für die visuelle Auszählung der Zellen wichtig, dass mit Hilfe des Laserscan-Mikroskops eine konfokale Durchlichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie möglich war. Bei dem Mikroskop handelte es sich um ein Lichtmikroskop, das mit einem Laser- und Scannermodul gekoppelt ist. Durch seine konfokale Eigenschaft sowie die Bildverarbeitungssoftware ließen sich dreidimensionale Auswertung der Proben gewinnen.

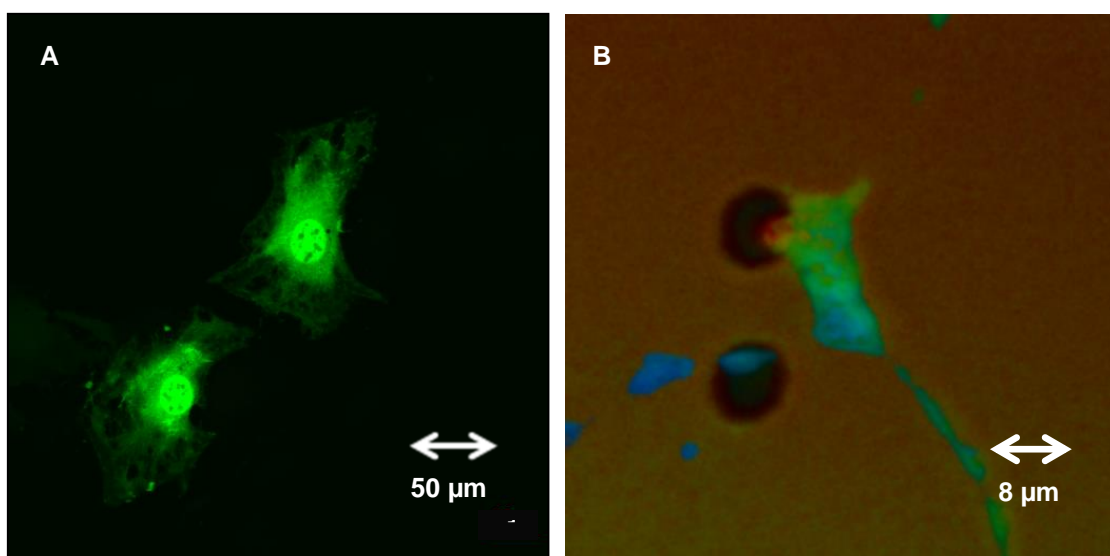


Abb. 18: GFP transfizierte Zellen im Fluoreszenzlicht (A), Darstellung der Trennschärfe mittels Farbcodierung in Tiefenabhängigkeit (B), jeweils exemplarische Darstellung

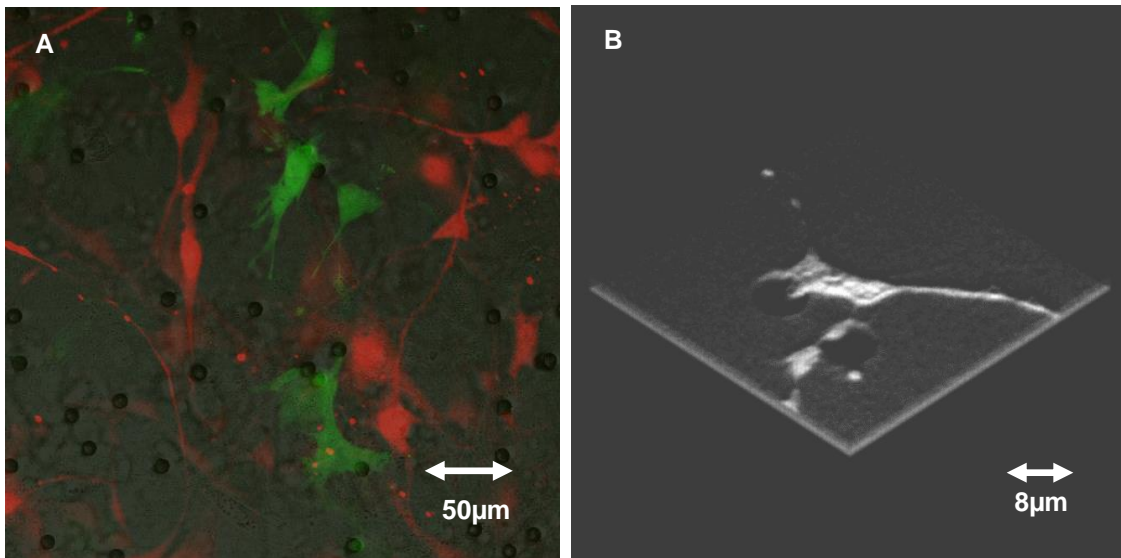


Abb. 19: differenzierte farbcodierte Zuordnung oberhalb und unterhalb der Porenebene lichtmikroskopisch (A) und 3D-Rekonstruktion laserscanmikroskopisch (B) mit Darstellung einer Pore, Porendurchmesser 8µm, exemplarische Darstellung (Behren *et al.*, 2005)

Hierdurch resultierte eine gute Tiefenschärfe, über die eine zuverlässige dreidimensionale Identifizierung der Zellen ermöglicht wurde. Zusätzlich verbessert wurde die Zuordnung durch farbige Belegung der Zellschichten und die Fluoreszenz, da damit eine Auszählung erfolgreich transfizierter Zellen einherging. In Abbildung 18 und 19 sind Beispiele für die verschiedenen Funktionen des Laserscan-Mikroskops aufgeführt, in Abbildung 20 Laserscanaufnahmen, um die hohe Bildqualität beispielhaft darzustellen.

In der ersten Versuchsanordnung wurden mit H-Ras transient transfizierte NIH-3T3-Zellen als Positivkontrolle und die mit p38 Isoform-Negativmutanten transient transfizierten NIH-3T3-Zellen auf ihren invasiven Phänotyp untersucht (Abb. 21). Als Kontrollreferenz dienten die Leervektoren für H-Ras und die p38-Negativmutanten (pSV2neo/pcDNA3). Per definitionem galt der Anteil als invadiert, der ausgehend vom oberen Kompartiment durch das Matrigel und die Pore in das untere Kompartiment der Boydenkammer infiltrierte. Die Fragestellung bezog sich auf das gehemmte Invasionsverhalten in Abhängigkeit der transfizierten p38-Negativmutanten und wurde prozentual nach Auszählung der Zellen oberhalb und unterhalb der Porenmembran errechnet (siehe Abb. 21). Die Versuchsdurchführung erfolgte 2-mal, jeder Versuch ging mit einer Auszählung von ca. 5000 Zellen einher, jedes Versuchsergebnis ist mit einer anderen Farbe hinterlegt.

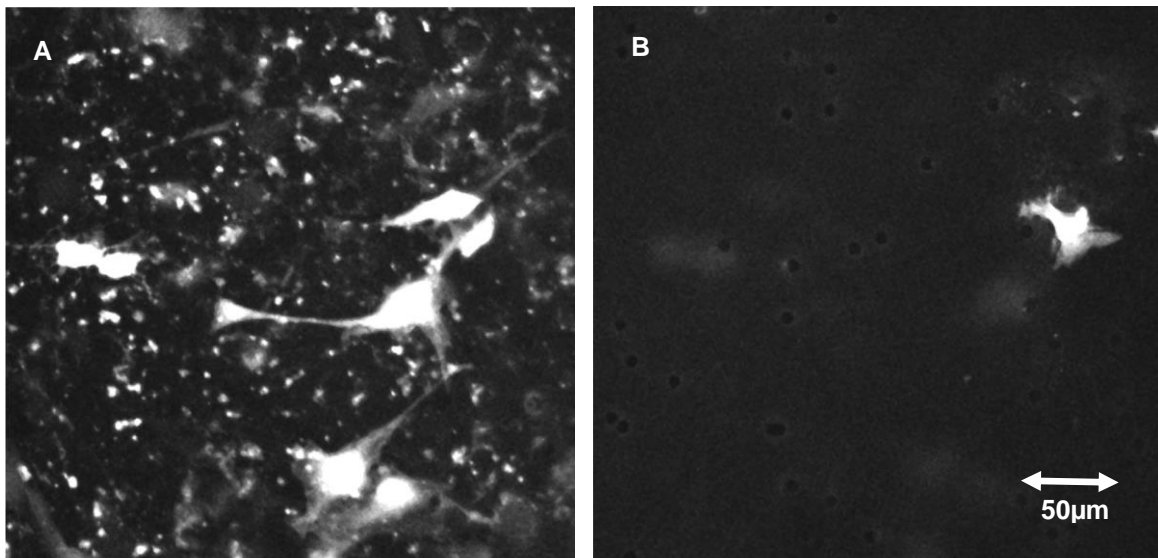
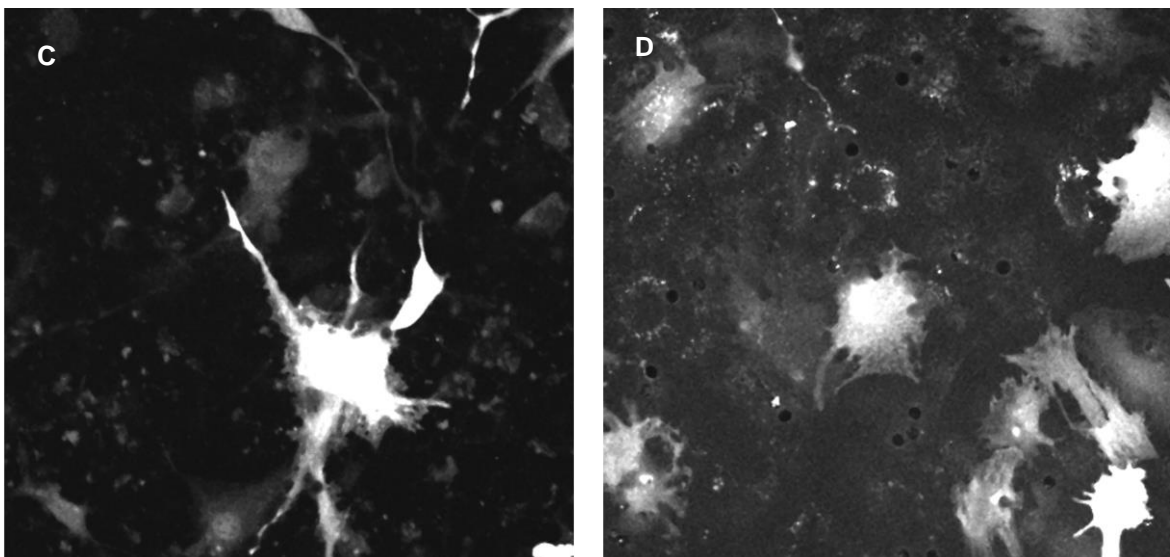


Abb. 20: Zellen oberhalb (A) und unterhalb (B) der Porenmembran bei transient mit einer p38 α Negativmutante (C) und mit H-Ras (D) transfizierten NIH-3T3, Größenangabe exemplarisch (B), (Behren *et al.*, 2005)



In der zweiten Versuchsanordnung wurden die NIH-3T3-Zellen stabil mit H-Ras transfiziert als Positivkontrolle den nicht transfizierten Mausfibroblasten als Negativkontrolle gegenübergestellt. Das Invasionsverhalten der stabil mit Ras-transfizierten NIH-3T3-Zellen (Abb. 22, Ras-NIH-3T3 Balken blau, lila, gelb) wurde dann auf das Ausmaß der Infiltration in Abhängigkeit des eingesetzten p38-Inhibitors SB 203580 (Abb. 22, Menge SB 203580 5 μ g lila Balken und 10 μ g orangener Balken) untersucht. Ergänzend wurde DMSO als Negativkontrolle gegen SB 203580 eingesetzt (Abb. 22, türkiser Balken). Die Auswertung erfolgte photometrisch, das Ergebnis bezüglich der Invasion wurde jeweils prozentual angegeben (siehe Tab. 5). Die Versuchsreihe wurde 4-mal durchgeführt.

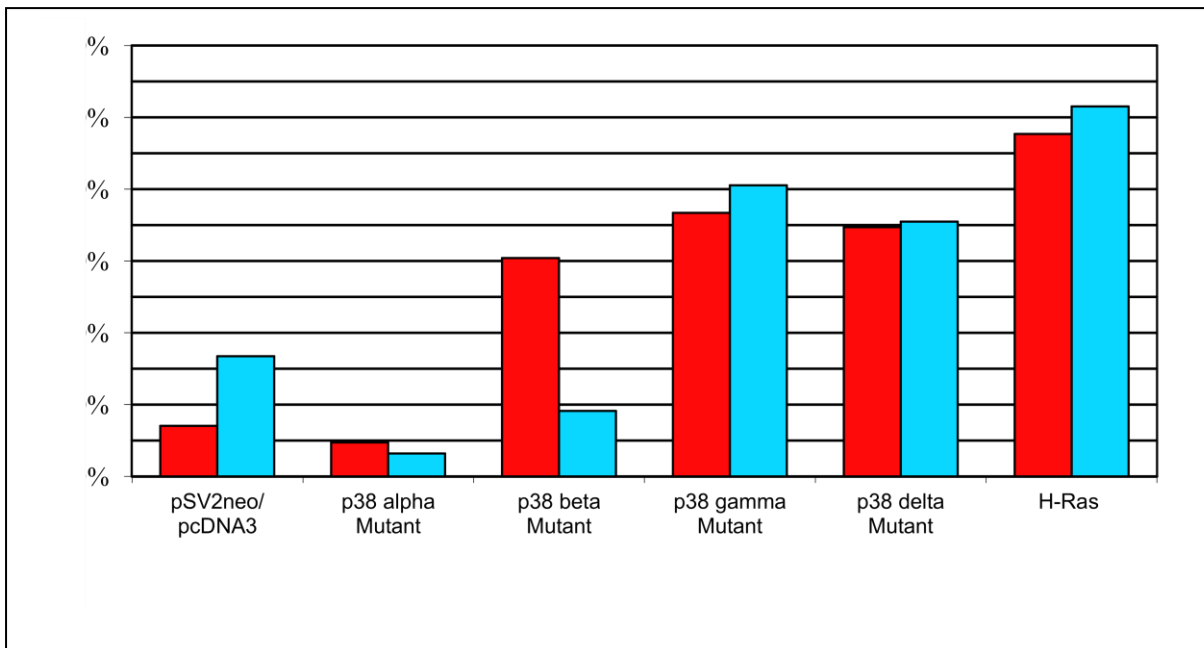


Abb. 21: Invasionsverhalten des NIH-3T3-Klons mit Transfektion der Kontrolle pSV2neo/pcDNA3, p38 Isoform Negativmutanten und H-Ras. Die Balkendiagramme zeigen die im Vergleich zu H-Ras transfizierten NIH-3T3 eintretende Invasion prozentual zur gesamten Zellzahl, jeder Balken repräsentativ für ein Invasions-Assay mit Auszählung von jeweils 5000 Mausfibroblasten

Auf das Ergebnis der ersten Versuchsanordnung, in der die Rolle der p38 Isoformen in Abhängigkeit des hochregulierten H-Ras-Onkogens untersucht wurde, wird nachfolgend eingegangen und bezieht sich auf Abbildung 21:

Die Positivkontrolle der mit H-Ras transfizierten NIH-3T3-Zellen zeigte den höchsten Anteil invadierter Zellen mit gemittelt 50% der Zellen. Die mit der Negativmutante (damit keine bestehende Funktionalität als p38 Isoform) für p38 δ und γ transfizierten NIH-3T3-Zellen verhielten sich mit einer im Vergleich zur Positivkontrolle anteiligen 35-40% etwas weniger infiltrativ. Auffallend war der mit der p38 α -Negativmutante transfizierte NIH-3T3-Klon. Dieser wies eine Invasionshemmung von mehr als 90% auf. Im Ergebnis lag die Inhibition der p38 α -Negativmutante unter der Kontrolle, die durch die Transfektion mit den Leervektoren für H-Ras und p38-Isoformen abgebildet wird. Das Ergebnis der p38 β -Negativmutante war variabel, da die beiden Invasionsassays eine unterschiedliche Invasionshemmung ausbilden. Während der erste Versuch einen im Vergleich zum H-Ras transfizierten NIH-3T3-Klon auf 30% reduzierten Invasionsanteil aufweist, wird im zweiten *in-vitro*-Invasionsassay eine Reduktion auf <10% erreicht.

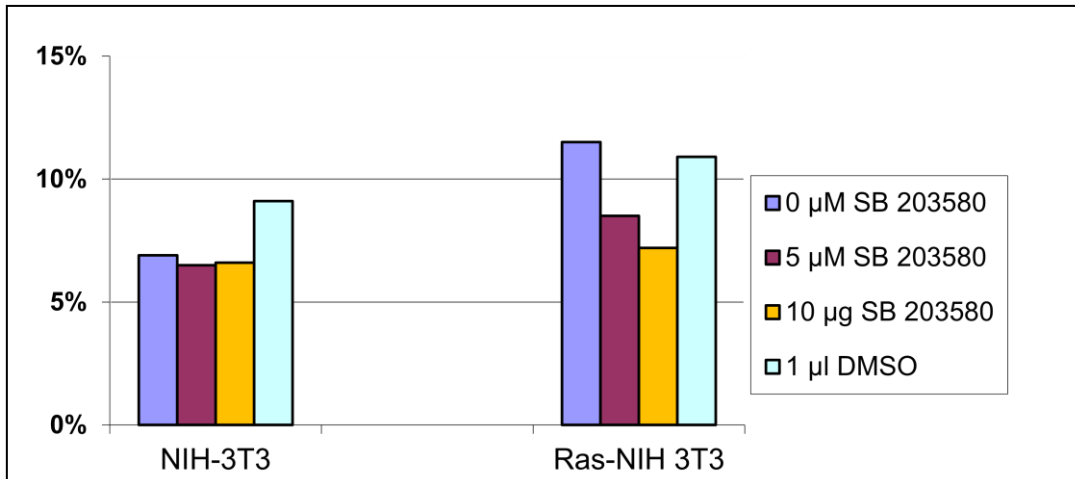


Abb. 22: Invasionsverhalten nicht transfizierter sowie stabil H-Ras-transfizierter NIH-3T3 Zellen unter konzentrationsdifferenter Exposition mit einem spezifischen p38 α -Inhibitor. DMSO entspricht der Negativ-Kontrolle, Referenzdaten für die Extinktionswerte sind in Tabelle 9 aufgeführt, n=4

Das Ergebnis der zweiten Versuchsanordnung (Abb. 22, Tab. 5) erbrachte bei den stabil mit H-Ras transfizierten NIH-3T3-Zellen (Abb. 22, Ras-NIH-3T3, Balken

<u>NIH-3T3</u>		oben				unten			
		1	2	3	4	1	2	3	4
	0 μ M SB	0.124	0.116	0.111	0.164	0.018	0.006	0.006	0.005
	5 μ M SB	0.103	0.093	0.25	0.104	0.008	0.006	0.007	0.013
	10 μ M SB	0.085	0.133	0.212	0.173	0.007	0.008	0.011	0.012
	1 μ l DMSO	0.094	0.114	0.091	0.183	0.011	0.005	0.013	0.014
<u>RAS NIH-3T3</u>		oben				unten			
		1	2	3	4	1	2	3	4
	0 μ M SB	0.126	0.101	0.101	0.125	0.012	0.009	0.014	0.018
	5 μ M SB	0.138	0.173	0.373	0.259	0.015	0.030	0.018	0.016
	10 μ M SB	0.140	0.191	0.171	0.493	0.016	0.016	0.020	0.021
A	1 μ l DMSO	0.164	0.122	0.254	0.274	0.015	0.030	0.016	0.049
<u>NIH-3T3</u>		Mittelwert oben		Mittelwert unten		Invasion in %			
B	0 μ M SB	0.129		0.009		6.9			
	5 μ M SB	0.138		0.009		6.5			
	10 μ M SB	0.151		0.010		6.6			
	1 μ l DMSO	0.121		0.011		9.1			
<u>Ras NIH-3T3</u>		Mittelwert oben		Mittelwert unten		Invasion in %			
	0 μ M SB	0.113		0.013		11.5			
	5 μ M SB	0.236		0.020		8.5			
	10 μ M SB	0.248		0.018		7.2			
	1 μ l DMSO	0.258		0.028		10.9			

Tab 5: photometrischer Extinktionswert nicht invadiierter und invadiierter Zellen (A) und nachfolgend berechnete Mittelwerte mit Angabe eines prozentualen Invasionsanteils (B), SB entspricht SB 203580, DMSO der Kontrolle, n=4

blau, lila, gelb) eine vom Hemmstoff dosisabhängige Reduktion der Invasion, während die nicht transfizierten Zellen (Abb. 22, NIH-3T3) von dem p38 Inhibitor SB 203580 unbeeinflusst waren.

Aus den *in-vitro*-Invasionsassays kann abgeleitet werden, daß p38 eine Rolle bei Invasionsprozessen spielt. Insbesondere wird der Signalweg über die Isoform p38 α vermittelt. Die Bedeutung der Isoform p38 β scheint einen, im Vergleich zu p38 α in deutlich geringerem Umfang, Einfluss auf Invasionsprozesse zu vermitteln. Bei variablem Ausmaß der Invasionshemmung ist eine eindeutige Bewertung nicht möglich. Für die Isoformen p38 γ und p38 δ ergab sich vergleichsweise kein inhibitorischer Einfluss. Es zeigte sich zusätzlich eine konzentrationsabhängige Reversibilität der Invasion von stabil H-Ras transfizierten NIH-3T3-Zellen unter Exposition eines spezifischen Inhibitors von p38-Isoformen.

4.0 Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass p38 im Zellkulturmodell mit Mausfibroblasten (NIH-3T3-Zellen) eine Ras-induzierte und Urokinase-abhängige Zunahme der Invasionspotenz von NIH-3T3-Zellen vermittelt.

Dabei spielte die Isoform p 38 α MAPK eine maßgebliche Rolle. Unter Gabe eines p38-Inhibitors oder alternativ dem Einsatz einer p38 Isoform Negativmutante, war die initial induzierte Invasionspotenz reversibel. Damit konnte erstmals die Beteiligung von p38 MAPK und Urokinase an der Steigerung der Invasionspotenz von Mausfibroblasten nachgewiesen werden.

Diese neuen Erkenntnisse wurden 2005 veröffentlicht (Behren A., Binder K. et al.; 2005; „The p38 SAPK pathway is required for Ha-ras induced in vitro invasion of NIH3T3 cells“; *Experimental Cell Research*, Vol. 303: 321–330).

Ausgangspunkt war die Frage nach der Rolle der MAPK p38 bei Tumorinvasionsprozessen am Modell von NIH-3T3-Zellen. Zuvor war ein MAPK/ERK, nicht aber eine die p38 MAPK belegte Vermittlung Ras-induzierter und Urokinase-/Cathepsin-vermittelter Migration von Tumorzellen dokumentiert (Janulis *et al.*, 1999). Explizit war die Beteiligung distinkter p38 Isoformen nicht untersucht. In Kenntnis der bereits beschriebenen signifikanten Strukturhomologie zwischen ERK und p38 (Wang *et al.*, 1997) postulierten wir eine durch p38-assoziierte Modulation der Invasionspotenz für Ras-assoziierte solide Tumoren: Die Ras-Signalkaskade wird nach onkogener Transformation für 30% der soliden Tumoren verantwortlich gemacht (Yamouchi *et al.*, 2016; Zhang und Cheong, 2016).

Dieser Sachverhalt wird im Kontext neuerer Ergebnisse nachfolgend diskutiert: Zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie war eine H-Ras-Transfektion von Mausfibroblasten als Modell etabliert (Stacey and Kung, 1984; Janulis *et al.*, 1999). Im Rahmen der Studie wurde die Transfektion von Mausfibroblasten mit dem Ras-Onkogen eingesetzt, um der Frage nach der Beteiligung einer nachgeschalteten Protease, konkret der Urokinase, als „downstream“ Effektor der Zellinvasion nachzugehen. So zeigten z. B. solide Tumoren, exemplarisch benannt seien gastrointestinale, pankreatische, gynäkologische oder urogenitale Tumoren, eine Aktivierung eines Ras-assoziierten Signalweges (Calvet *et al.*, 1996; Hernández-

Alcoceba et al., 2000; Miyakura et al., 2002; Carcia-Rostan et al., 2003; Kim et al., 2003). H-Ras, nicht aber K-Ras oder N-Ras wurde für die Ras-/MAPK-Signalinteraktion verantwortlich gemacht.

4.1 Die Isoform p38 α MAPK vermittelt eine Ras-induzierte Urokinase-Expression in NIH-3T3 Zellen

In der vorliegenden Studie wurde erstmals ein Zusammenhang einer Ras-vermittelten und über p38 transduzierten Signalkaskade für die Invasion von Mausfibroblasten gestützt. Chen und Kollegen zeigte eine Aktivierung von 3 MAPK's ERK, JNK und p38 in mit H-Ras transfizierten Mausfibroblasten, ohne die p38 Isoformen zu spezifizieren (Chen *et al.*, 2000). Auch wurde der Einfluss der MAPK-Kaskade nicht explizit mittels *in-vitro*-Invasionsassays analysiert und spezifiziert.

In der vorliegenden Studie gelang der Nachweis einer von H-Ras ausgehenden und über die Isoform p38 α vermittelten Signaltransduktion mit nachgeschalteter Proteolyse in mit H-Ras transfizierten NIH-3T3-Zellen. Dies bestätigt und spezifiziert vorherige Befunde der Beteiligung von α , β , γ und δ p38 Isoformen in Lungen- und Nierentumoren (Mayor et al., 2007; Grossi et al., 2014).

Neben der unmittelbaren Beteiligung von p38 α an der Proteasen-Expression, ergeben sich darüber hinaus Hinweise auf einen Einfluss von p38 auf Adhäsions- und Migrationsprozesse. Im Anschluss an die Studie von Behren, Binder 2005, konnte für die Isoformen p38 α und p38 β eine alternative Kaskadenaktivierung über T-Zell-Rezeptoren mit resultierender Cytokinfreisetzung (z. B. TNF α) belegt werden (Alam *et al.*, 2015). Ferner konnte eine p38 α -vermittelte Selektin-Expression in CD4 T-Zellen nachgewiesen werden (Ebel *et al.*, 2015).

4.2 Die Invasionspotenz von Mausfibroblasten wird über eine Ras-/p38 α -induzierte u-PA-Aktivierung erhöht

Zur Bewertung der u-PA-Aktivität wurde das Westernblot-Verfahren herangezogen. In diesem konnte nachgewiesen werden, dass die Urokinase-Expression im mit H-Ras transfizierten NIH-3T3-Zellen im Vergleich zu der nicht transfizierten

Kontrolle deutlich gesteigert war. Diese Expression war unter Gabe eines p38-Inhibitors (SB 203580) reversibel.

Der u-PA-CAT-ELISA (Fremdleistung von Herrn Andreas Behren aus der Arbeitsgruppe Dr. med. Simon), der die p38 Isoformen auf Ihre unter H-Ras exprimierte u-PA-CAT-Promoter-Aktivität untersuchte, belegte im Ergebnis eine konzentrationsabhängige Induktionshemmung der u-PA-CAT-Promoter-Aktivität für die Negativmutante der Isoform p38 α . Somit wurde eine führend über H-Ras und p38 α vermittelte u-PA-Expression nachgewiesen.

Ferner fiel, im Gegensatz zu dem Ergebnis der Negativmutanten p38 γ und p38 δ , unter transfizierter p38 β -Negativmutante ein unverändert diskreter Nachweis des u-PA-CAT-Promoterkonstruktes auf. Dies wurde als Folge der hohen Homologie zwischen p38 α und p38 β mit einer resultierenden Kreuzaktivierung bei stets submaximaler Transfektionspenetranz diskutiert.

Neuartig an dieser Studie war der erstmalige lückenlose Nachweis einer Ras-assoziierten und führend über die Isoform p38 α -vermittelten Urokinase-Expression in mit H-Ras transfizierten NIH-3T3-Zellen.

Auf Basis der Studiendaten dieser Dissertation, wurde der Nachweis einer Ras-/p38-vermittelten Induktion von FOXM1 erbracht (Behren *et al.*, 2010). FOX M1 ist als Transkriptionsfaktor an Tumorinvasion und Adhäsionsverlust beteiligt.

Ausgehend von dem nun etablierten Modell mit Mausfibroblasten, einen Urokinase-assoziierten invasiven Phänotyp zu untersuchen (Han *et al.*, 2002, Lee *et al.* 2003; Shin *et al.*, 2003), wurde im Verlauf die Relevanz des u-PA-Systems deutlich, da sich in zahlreichen Tumoren eine u-PA-Aktivität darstellte (Mekaway *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 1996). Diese zeigten bei nachweislicher Ras-abhängiger Urokinase-Expression eine hohe Übereinstimmung mit den Entitäten der für die Ras-Onkogene beschriebenen Tumorbeteiligungen auf. Angesichts der resultierenden breiten Spezifität, wird neuerdings ein Einsatz als Tumormarker, beispielsweise bei dem Mammakarzinom, diskutiert (McMahon and Kwaan, 2015).

4.3 Die Invasionspotenz infiltrierender Mausfibroblastenzellen Auswertung kann im *in-vitro*-Invasionsassays verfolgt werden

Neuartig war die Auszählung mit einem konfokalen Laserscanmikroskop additiv zur klassischen Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie.

Als Modell wurde ein *in vitro* Invasionsassay unter Verwendung von mit p38 Isoform-Negativmutanten und H-Ras transfizierten Fibroblasten etabliert. Im Ergebnis wurde eine H-Ras-/p38-abhängige und Urokinase-vermittelte Zunahme an invadierenden NIH-3T3-Zellen nachgewiesen. Diese Signalweiterleitung erfolgte offenbar über die Isoform p38 α . So zeigte sich weder für die Isoformen p38 γ und p38 δ noch für die p38 β -Isoform eine zu p38 α vergleichbare Invasionspotenz.

Daher war die Korrelation des *in-vitro*-Invasionsassay mit dem uPA-Cat-Promoterversuch wichtig, um das Ergebnis der CAT-Promoter-Aktivität gegenüberzustellen. Hierbei stellte sich keine vergleichbare Expressionsvariabilität von p38 β im ELISA dar. Daher wurde das variable Invasionsverhalten der p38 β Negativmutante im Invasionsassay nicht als Klasseneffekt gewertet.

Während die Photometrie als Routineverfahren etabliert ist, war für die Mikroskopie-basierte Auswertung von *in-vitro*-Invasionsassays zum Zeitpunkt der Dissertationsarbeit kein vergleichbarer Standard eruierbar. Im weiteren Verlauf etablierte sich der Einsatz der konfokalen Mikroskopie. Zuletzt dokumentierte die Arbeitsgruppe um Yamauchi und Kollegen eine Beteiligung des Ras-/p38-Signalweges mit Nachweis einer reduzierten Lamellipodienformation unter Signalwegsuppression mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie (Yamauchi *et al.*, 2016).

Ferner wiesen die mit H-Ras transient transfizierten NIH-3T3-Zellen in der konfokalen Mikroskopie eine im Vergleich zu der nicht transfizierten NIH-3T3-Kontrolle (Negativkontrolle) morphologische Veränderung auf: Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigten sich, vereinbar mit einem malignen Phänotyp, vermehrt Lamellipodien und ein vergrößerter Zellkörper mit einer Kern-Plasma-Relation zugunsten des Nukleus.

Die klinische Relevanz der onkogenen Transformation bekannter Proto-Onkogene ist für viele Tumorarten bekannt, insbesondere ist das neoplastische Potential für den Ras-/MAPK-Signalweg belegt und seit dieser Zeit bestätigt (Lei *et al.*, 2014): Ein Zusammenhang mit pulmonalen, gastrointestinalen, gynäkologischen, urologischen und kutanen Malignomen ist beschrieben. Dabei wird bei einer neoplastischen Transformation eine onkogene Ras-Beteiligung in 30% postuliert (Mason *et al.*, 2016).

Bislang wurden die Tumorinvasionsprozesse als bewährte neoplastische Sequenz, ausgehend von der Genominstabilität über Migration und Adhäsion bis zur Invasion, angesehen (Hernández *et al.*, 2000; Mitra *et al.*, 2006; Behren *et al.*, 2010; Mason *et al.*, 2016). Im Verlauf traten weitere Erkenntnisse zutage, die eine alternative Aktivierung des Ras-/p38-Signalweges über T-Zell-Rezeptoren belegten. Als Folge wurde eine sich aggravierende Tumorerkrankung durch induzierte Freisetzung von Zytokinen (z. B. $\text{TNF}\alpha$) nachgewiesen (Alam *et al.*, 2015).

Neben der Bedeutung für Tumorinvasion wurde für die MAPK p38 eine alternative Aktivierung der Signalkaskade diskutiert: So konnte im Mausmodell eine durch alternative Aktivierung der MAPK p38 resultierende systemische chronische Inflammation, eine autoimmune Encephalomyelitis und rheumatoide Arthritis aufgezeigt werden (Alam *et al.*, 2014; Jirmanova *et al.*, 2011); diese wurde nachweislich durch Cytokininduktion, z. B. $\text{TNF}\alpha$ und Interferon γ , hervorgerufen. Die Folgekomplikationen waren unter Inhibition der alternativen Aktivierung von p38 reversibel.

Parallel mit den neuen Erkenntnissen halten antikörperbasierte „targeted“ Therapien Einzug, die sich gegen Signalproteine auf jeder Ebene (Wachstumsrezeptor, Kinasenproteine des SAPK-/MAPK-Signalweges) richten. Ein Teil der Antikörper ist bereits zugelassen, zum Beispiel Trametinib (Mekinist®) bei Melanomerkkrankungen. Der überwiegende Anteil der Produktklasse ist noch in der präklinischen Zulassungsphase (Uehling und Harris, 2015).

Als weiterer Ansatz wird bei Ras-assoziierten Pankreaskarzinomen eine Impfung gegen Peptide des Ras-Proteins diskutiert (Bournet *et al.*, 2015), wobei sich der

Erfolg trotz modifizierter Peptidmuster bislang nicht hatte signifikant darstellen lassen.

Mittelfristig sind die Konzepte der „targeted“ Therapie als guter Kombinationsversuch einzustufen. Auch wenn sich aktuell noch kein kurativer Ansatz bei Malignomen abzeichnet, so sind die modularen Konzepte, beispielsweise eine Chemotherapie in Kombination mit der antikörperbasierten „targeted“ Therapie, bereits ein wichtiger Schritt für die beste supportive Therapieplanung bei Tumorpatienten.

5.0 Zusammenfassung

Tumorassoziierte Mortalität steht nach Angaben des Statistischen Bundesamtes bundesweit nach wie vor an zweiter Stelle aller Todesursachen. Die Tumorerkrankung und Metastasierung gilt hier als primärer Faktor der hohen Mortalität. Das Ras-Onkogen spielt für die Tumorerkrankungen eine führende Rolle. Es blieb jedoch zunächst unklar, welche der p38-Isoformen an diesem durch Ras-Aktivierung mediierten und die Tumorerkrankung fördernden Signalprozeß beteiligt waren. In der vorliegenden Studie wurde erstmals nachgewiesen, daß eine Signaltransduktion mit erhöhter Urokinase-Expression (u-PA), induziert durch ein aktiviertes Ras-Onkogen, überwiegend über die Isoform p38 α vermittelt wird.

Nach Gabe eines p38-Inhibitors (SB 203580) unter konstitutiv hochreguliertem Ras-/p38 α -Signalweg zeigte sich eine reversible u-PA-Expression, die Ausdruck einer Invasionspotenz ist.

Das Ergebnis dieser Studie wurde 2005 veröffentlicht (Behren A, Binder K. et al.; 2005; „The p38 SAPK pathway is required for Ha-ras induced in vitro invasion of NIH3T3 cells“; Experimental Cell Research, Vol. 303: 321–330).

Ausgehend von der über die Ras- und die Isoform p38 α vermittelte Proteaseninduktion bei Tumorerkrankung, wurden nachfolgend Studien über die Rolle der Isoform p38 α bei kolorektalen Tumoren und Tumoren der Leber und der Lunge aufgenommen. Für das Mammakarzinom ist mit hohem Expressionsniveau der MAPK p38 eine begrenzte Prognose assoziiert. Eine differenzierte Bewertung der an der Signalvermittlung beteiligten Isoformen steht noch aus (Grossi et al., 2014;Wagner and Nebreda, 2009;Igea and Nebreda, 2015).

Damit zeigt sich, daß die in der Veröffentlichung von Behren und Kollegen 2005 beschriebene Beteiligung der MAPK Isoform p38 α an einer induzierten Invasionspotenz von Mausfibroblasten ein Signalweg ist, der nach wie in der Tumorforschung bei abnormer Aktivierung im Hinblick auf die Induktion metastatischer Kompetenz eine Rolle spielen wird.

6.0 Literaturverzeichnis

Alam M, Gaida M, Bergmann F, Lasitschka F, Giese T, Giese N, Hackert T, Hinz U, Hussain S, Kozlov S, Ashwell J (2015) Selectiv inhibition of the p38 alternative activation pathway in infiltrating T cells inhibits pancreatic cancer progression. *Nature Medicine* 21: 1337-1342.

Alam M, Gaida M, Ogawa Y, Kolios A, Lasitschka F, Ashwell J (2014) Counter-regulation of T-Cell effector function by differentially activated p38. *J. Exp. Med* 211: 1257-1270.

Barbacid M (1987) Ras Genes. *Annu Rev Biochem* 56:449-827.

Behren A, Binder K, Vucelic G, Herberhold S, Hirt B, Loewenheim H, Preyer S, Zenner HP, Simon C (2005) The p38 SAPK pathway is required for Ha-ras induced in vitro invasion of NIH3T3 cells. *Exp Cell Res* 303: 321-330

Behren A, Mühlen S, Acuna Sanhueza G, Schwager C, Plinkert P, Huber P, Abdollahi A, Simon C (2010) Phenotype-assisted transcriptome analysis identifies FoxM1 downstream from Ras-MKK3-p38 to regulate in vitro cellular invasion. *Oncogene* 29: 1519-1530.

Bourne H, Sanders D, McCormick F (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-127.

Bournet B, Buscail C, Muscari F, Cordelier P, Buscail L (2015) Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *European Journal of Cancer* 54: 75-83.

Buschmann T, Potapova O, Bar-Shira A, Ivanov V, Fuchs S, Henderson S, Fried V, Minamoto T, Alcarcon-Vargas D, Pincus M, Gaarde W, Holbrook N, Shilo Y, Ronai Z (2001) Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol* 21: 2743-2754.

Calvert R, Buzard G, Anisimov V, Rice J (1996) K-ras codon 12 and 61 point mutations in bromodeoxyuridine- and N-nitrosomethylurea-induced rat renal mesenchymal tumors. *Cancer Lett* 109: 1-7.

Chen G, Hitomi M, Han J, Stacey D (2000) The p38 Pathway Provides Negative Feedback for Ras Proliferative Signaling. *JBC* 275: 38973-38980.

Chien C, Chen C, Kuo H, Shi C, Hsieh M, Kuo Y, Tung S, Lee K, Huang W (2015) Interleukin-17 induces CC chemokine receptor 6 expression and cell migration in colorectal cancer cells. *J Cell Physiol* 230: 1430-1437.

Chipperfield R, Jones S, Lo K, Weinberg R (1985) Activation of Ha-ras p21 by substitution, deletion, and insertion mutations. *Mol Cell Biol* 5:1809-1813.

Cobb M, Goldsmith E (1995) How MAP Kinases are regulated. *JBC* 270: 14843-14846.

Cone R, Mulligan R (1984) High-efficiency gene transfer into mammalian cells: Generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6349-6353.

Denhardt D (1996) Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J* 318: 729-747.

Dérijard B, Hibi M, Wu I, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis R (1994) JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76: 1025-1037.

Dong C, Davis R, Flavell R (2001) Signaling by the JNK Group of MAP Kinases. *J Clin Immunol* 21: 253-257.

Ebel M, Awe O, Kaplan M, Kansas G (2015) Diverse Inflammatory Cytokines Induce Selectine Ligand Expression on Murine CD4 T Cells via p38 alpha MAPK.pdf. *J Immunol* 194: 5781-5788.

Etienne-Manneville S (2004) Actin and Microtubules in Cell Motility: Which One is in Control? *Traffic* 5: 470-477.

Felgner P, Gadek T, Holm M, Roman R, Chan H, Wenz M, Northrop J, Ringold G, Danielsen M (1987) Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7413-7417.

Garrod D, Merritt A, Nie Z (2002) Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 14: 537-545.

Gaßmann P, Enns A, Haier J (2004) Role of Tumor Cell Adhesion and Migration in Organ - Specific Metastasis Formation. *Onkologie* 27: 577-582.

Grossi V, Peserico A, Tezil T, Simone C (2014) p38 α MAPK pathway: A key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World J Gastroenterol* 20: 9744-9753.

Herreros-Villanueva M, Chen C, Yuan S, Liu T, Er T (2014) KRAS mutations: analytical considerations. *Clinica Chimica Acta* 431: 211-220.

Hunter T (1995) Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell* 80: 225-236.

Hynes R, Zhao Q (2000) The Evolution of Cell Adhesion. *JCB* 150: F89-F95.

Igea A, Nebreda A (2015) The Stress Kinase p38 α as Target for Cancer Therapy. *Cancer Res* 75: 3997-4002.

Janulis M, Silbermann S, Ambegaokar A, Gutkind J, Schultz R (1999) Role of Mitogen-activated Protein Kinases and c-Jun/AP-1 trans-Activating Activity in the Regulation of Protease mRNAs and the Malignant Phenotype in NIH 3T3 Fibroblasts. *JBC* 274: 801-813.

Jeong S, Hong H, Kwak J, Lee E (2015) Analysis of RAS mutation and PAX8/PPAR γ rearrangements in follicular-derived thyroid neoplasms in a Korean population: frequency and ultrasound findings. *J Endocrinol Invest* 38: 849-857.

Jirmanova L, Gardino Torchia M, Sarma N, Mittelstaedt P, Ashwell J (2011) Lack of T cell-specific alternative p38 activation pathway reduces autoimmunity and inflammation. *Blood* 118: 3280-3289.

Ju J, Kim SJ, Jun C, Chun J (2002) p38 Kinase and c-Jun N-Terminal Kinase Oppositely Regulates Tumor Necrosis Factor -Induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Cell Adhesion in Chondrosarcoma Cells. *IUBMB* 54: 293-299.

Karnoub A, Weinberg RA (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 517-531.

Keyse S (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 12: 186-192.

Kyriakis J, Avruch J (1996) Sounding the Alarm: Protein Kinase Cascades Activated by Stress and Inflammation. *JBC* 271: 24313-24316.

Kyriakis J, Avruch J (2001) Mammalian Mitogen - Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869.

Kyriakis J, Banarjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie E, Ahmad M, Avruch J, Woodgett J (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369: 156-160.

Lei Y, Wang J, Wang C (2014) Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 8539-8548.

Lowy D, Willumsen B (1993) Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 62: 851-891.

Loyter A, Scangos G, Ruddle F (1982) Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: Fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 422-426.

Mason J, Davison-Versagli C, Leliaert A, Pape D, McCallister C, Zuo J, Durbin S, Buchheit C, Zhang S, Schafer Z (2016) Oncogenic Ras differentially regulates metabolism and anoikis in extracellular matrix-detached cells. *Cell Death Differ*, advance online publication doi:10.1038/cdd.2016.15: 1-12.

Mayor FJ, Jurado-Pueyo M, Campos P, Murga C (2007) Interfering with MAP Kinase Docking Interactions: Implications and Perspectives for the p38 Route. *Cell Cycle* 6: 528-533.

McMahon B, Kwaan H (2015) Components of the Plasminogen-Plasmin System as Biologic Markers for Cancer. *Adv Exp Med Biol* 867: 145-156.

Mekkawy A, Pourgholami M, Morris DL (2014) Involvement of Urokinase-Type Plasminogen Activator System in Cancer: An Overview. *Med Res Rev* 34: 918-956

Moreira-Carboni S, Rodrigues-Lima N, Pinheiro N, Tavares-Murta B, Crema V (2015) HA-1077 inhibits cell migration / invasion of oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Drugs* 26: 923-930.

Nasr A, Nutin M, Palombo B, Guerra E, Alberti S (2003) Mutations of TP53 induce loss of DNA methylation and amplification of the TROP1 gene. *Oncogene* 22: 1668-1677.

Nicolson G, Gallick G, Dulski K, Spohn W, Lembo T, Tainsky M (1990) Lack of correlation between intercellular junctional communication, p21rasEJ expression, and spontaneous metastatic properties of rat mammary cells after transfection with c-H-rasEJ or neo genes. *Oncogene* 5: 747-753.

Parada L, Tabin C, Shih C, Weinberg R (1982) Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297: 474-478.

Porte H, Triboulet J, Kotelevets L, Carrat F, Prévot S, Nordlinger B, DiGioia Y, Wurtz A, Comoglio P, Gespach C, Chastre E (1998) Overexpression of Stromelysin - 3, BM - 40 / SPARC, and MET Genes in Human Esophageal Carcinoma: Implications for Prognosis. *Clin Cancer Res* 4: 1375-1382.

Ray L, Sturgill T (1988) Characterization of Insulin-stimulated Microtubule-associated Protein Kinase. *JBC* 263: 12721-12727.

Sabatini N, Di Giacomo V, Rapino M, Rana R, Giuseppe F, Cataldi A (2005) JNK/p53 mediated cell death response in K562 exposed to etoposide-ionizing radiation combined treatment. *JCB* 95: 611-619.

Sangrar W, Shi C, Mullins G, LeBrun D, Ingalls B, Greer P (2015) Amplified Ras-MAPK signal states correlate with accelerated EGFR internalization, cytostasis and delayed HER2 tumor onset in Fer-deficient model systems. *Oncogene* 34: 4109-4117.

Schneeberger E, Lynch R (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1213-C1228.

Seeburg P, Colby W, Capon D, Goeddel D, Levinson A (1984) Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature* 312: 71-75.

Seger R, Krebs E (1995) The MAPK signaling cascade. *EMBO* 9: 726-735.

Seki E, Brenner D, Karin M (2012) A Liver Full of JNK: Signaling in Regulation of Cell Function and Disease Pathogenesis, and Clinical Approaches. *Gastroenterology* 134: 307-320.

Shun M, Yu W, Gapor A, Parsons R, Atkinson J, Sanders B, Kline K (2005) Pro-apoptotic Mechanisms of Action of a Novel Vitamin E Analog (a-TEA) and a Naturally Occurring Form of Vitamin E (d-Tocotrienol) in MDA-MB- 435 Human Breast Cancer Cells. *Nutr Cancer* 48: 95-105.

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff R, van Dyke T (2004) pRb Inactivation in Mammary Cells Reveals Common Mechanisms for Tumor Initiation and Progression in Divergent Epithelia. *PLoS Biol* 2: 0194-0205.

Simon C, Simon M, Vucelic G, Hicks M, Plinkert P, Koitschev A, Zenner H (2001) The p38 SAPK Pathway Regulates the Expression of MMP-9 Collagenase via AP-1 Dependant Promoter Activation. *Exp Cell Res* 271: 344-355.

Stacey D, Kung H (1984) Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein. *Nature* 310: 508-511.

Stetler-Stevenson W, Yu A (2001) Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Seminars in Cancer Biology* 11: 143-152.

Strelkov S, Herrmann H, Aebi U (2003) Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25: 243-251.

Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K (2000) TAB2, a Novel Adaptor Protein, Mediates Activation of TAK1 MAPKKK by Linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 Signal Transduction Pathway. *Mol Cell* 5: 649-658.

Takai Y, Sasaki T, Matizaki T (2001) Small GTP - Binding Proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208.

Trojanovsky S (2005) Cadherin dimers in cell-cell adhesion. *Eur J Cell Biol* 84: 225-233.

Uemara K, Hiyama E, Murakami Y, Kanehiro T, Ohge H, Sueda T, Yokoyama T (2003) Comparative analysis of K-ras point mutation, telomerase activity, and p53 overexpression in pancreatic tumours. *Onc Rep* 10: 277-283.

Wagner E, Nebreda A (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9: 537-549

Walsh M, Thamilselvan V, Grotelueschen R, Farhana L, Basson M (2003) Absence of Adhesion Triggers Differential FAK and SAPKp38 Signals in SW620 Human Colon Cancer Cells that may Inhibit Adhesiveness and Lead to Cell Death. *Cell Physiol Biochem* 13: 135-146.

Wang Z, Harkins P, Ulevitch R, Han J, Cobb M, Goldsmith E (1997) The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1 - A resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2327-2332.

Wei S, Liang Z, Gao J, Wu S, Zhu H, Liu H, Liu T (2005) Patterns of K-ras codon 12 and 13 mutations found in pancreatic adenocarcinoma of 30 Chinese patients by microdissection, PCR and direct sequencing. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 67-72.

Widmann C, Gibson S, Jarpe M, Johnson G (1999) Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiol Rev* 79: 143-180.

Wybranietz W, Prinz F, Spiegel M, Schenk A, Bitzer M, Gregor M, Lauer U (1999) Quantification of VP22-GFP spread by direct fluorescence in 15 commonly used cell lines. *J Gene Med* 1: 265-274.

Yamada K (1991) Adhesive Recognition Sequences. *JBC* 266: 12809-12812.

Yamauchi S, Hou Y, Guo A, Hirata H, Nakajima Q, Yip A, Yu C, Harada I, Chiam K, Sawada Y, Tanaka N, Kawauchi K (2016) p53-mediated activation of the mitochondrial protease HtrA2/Omi prevents cell invasion. *JCB* 204: 1191-1207.

Yoshida H, Hastie C, McLauchlan H, Cohen P, Goedert M (2004) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J Neurochem* 90: 352-358.

Zhang P, Calaf G, Russo J (1994) Allele loss and point mutation in codons 12 and 61 of the c-Ha-ras oncogene in carcinogen-transformed human breast epithelial cells. *Mol Carcinog* 9: 46-56.

Zhao P, Chen L, Shao H, Zhang Y, Sun Y, Ke Y, Ramakrishna S, He L, Xue W (2016) Cytotoxic and adhesion-associated response of NIH-3T3 fibroblasts to COOH-functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Biomedical Materials*. ahead of print.

Zhou S, Matsuyoshi N, Liang S, Takeuchi T, Ohtsuki Y, Miyachi Y (2002) Expression of T-Cadherin in Basal Keratinocytes of Skin. *J Invest Dermatol* 118: 1080-1084.

7.0 Erklärung zum Eigenanteil

- Die Fragestellung dieser Arbeit wurde von Herrn Dr. med. Simon entworfen
- Die Versuche sowie die Auswertung wurden mit einer Ausnahme von mir erbracht: Daten bezüglich der Ras-vermittelten u-PA-Cat-Promoteraktivität (Punkt 3.3.5) wurden mir von Andreas Behren zur Verfügung gestellt.
- Die arbeitsbezogene Datenrecherche erfolgte via Medline / Pubmed von mir über die Tübinger elektronische Zeitschriftenbibliothek.
- Die Arbeit betreute initial Dr. med. Simon, im Verlauf Frau Prof. Dr. rer. nat. Knipper.
- Die Veröffentlichung anteiliger Ergebnisse im „Experimental Cell Research“ wurde von Herrn Andreas Behren mit den von mir erbrachten und zur Verfügung gestellten Daten verfasst.

8.0 Veröffentlichung

Teile der Dissertationsschrift wurden bereits in der vorliegenden Publikation veröffentlicht:

Andreas Behren, Konrad Binder, Goran Vucelic, Stephan Herberhold, Bernhard Hirt, Hubert Loewenheim, Serena Preyer, Hans Peter Zenner, Christian Simon – „The p38 SAPK pathway is required for H-ras induced in vitro invasion of NIH3T3 cells“ - Experimental Cell Research – 2005 – Vol. 303 – Seiten 321 - 330

9.0 Danksagung

Ich danke Herrn Dr. med. Simon für die Bereitstellung des Promotionsthemas und meiner Arbeitsgruppe für die engagierte und freundliche Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Knipper, die sich altruistisch als betreuende Doktormutter einbrachte, um meiner Dissertation nach langer Ruhephase Verwirklichung zu ermöglichen.

Weiterer Dank gilt der „Deutschen Forschungsgemeinschaft“, die diese Arbeit mit einem Stipendium finanziert hat und die experimentelle Phase ermöglichte.

Nicht zuletzt und ganz herzlich danke ich meiner Frau und meiner Familie, die mir zu jedem Zeitpunkt zur Seite standen.