Abteilung Innere Medizin I
Leiter: Prof. Dr. G. Adler

Analyse der TGFβ1-induzierten MAPK- und RhoA-Aktivierung in epithelialen Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm
vorgelegt von Oliver Waidmann
aus Böblingen
2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Andre Menke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Fischer

Tag der Promotion: 29.06.2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis V

1. Einleitung

1.1 Die TGFβ-Familie 1
1.2 Smad-abhängige Signaltransduktion 2
1.3 Smad-unabhängige Signaltransduktion 4
1.4 Das Zytoskelett und Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion 7
1.5 Die Bedeutung von TGFβ für die epitheliale Transdifferenzierung 8
1.6 Fragestellung 10

2. Material und Methoden

2.1 Material
2.1.1 Antikörper 11
2.1.2 Protease- und Phosphatase-Inhibitoren 12
2.1.2.1 Proteaseinhibitoren 12
2.1.2.2 Phosphataseinhibitoren 12
2.1.3 Puffer und Lösungen 13
2.1.4 Geräte 16
2.1.5 Zelllinien 16
2.1.6 Sonstiges 17
2.2 Methoden
2.2.1 Zellkultur 18
2.2.2 Herstellung von Proteinlysaten 18
2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung 19
2.2.4 Rho-Assay 20
2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 21
2.2.6 Immunoblot 22
2.2.7 Ponceaurotfärbung von Nitrozellulosemembranen 22
2.2.8 Immunfärbung 23
2.2.9 Proteindetektion durch Chemolumineszenz 23
2.2.10 Elution gebundener Antikörper 24
2.2.11 Proteindetektion durch alkalische Phosphatase 24

2.2.12 Immunfluoreszenzfärbung 25
2.2.13 Statistik 25

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung epithelialer Zelllinien
3.1.1 TGFβ-Rezeptoren 26
3.1.2 Smad-Proteine 28
3.2 TGFβ1-Stimulation 29
3.2.1 TGFβ1-induzierte Aktivierung von RhoA 29
3.2.2 TGFβ1-Einfluss auf die Aktivierung der p38-MAPK 34
3.2.3 TGFβ1-induzierte ERK-Aktivierung 36
3.2.4 TGFβ1-Einfluss auf das Aktinzytoskelett
und Zell-Zell-Verbindungen 39
3.2.5 TGFβ1–Einfluss auf das Tubulinzytoskelett 45

4. Diskussion

4.1 Mitglieder des klassischen TGFβ-Signalweges in epithelialen Zellen 47
4.2 TGFβ1-Einfluss auf GTPasen und ihre Bedeutung für die Organisation des Zytoskeletts 48
4.3 Der Einfluss von TGFβ1 auf die Aktivierung von MAP-Kinasen und die Auswirkungen auf das Zytoskelett und die Zellmigration 50
4.4 TGFβ1-Einflüsse auf das Aktinzytoskelett 55
4.5 TGFβ1-Einflüsse auf das Tubulinzytoskelett 57

5. Zusammenfassung 59

6. Literaturverzeichnis 61

Danksagung
Veröffentlichungen
Lebenslauf

Abkürzungen

ActRII	*activin A receptor*
ADP	Adenosindiphosphat
ALK	*Activin receptor-like kinase*
AMHR	*anti-Mullerian hormone receptor*
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	*American Type Culture Collection*
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat
BMP	*bone morphogenetic protein*
BMPR	*bone morphogenetic protein receptor*
BSA	*bovines serum albumin*
Ca	Kalzium
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
Cdc 42	*cell division cycle 42*
CMF-PBS	*calcium- and magnesium-free phosphate buffered saline*
CO_2	Kohlenstoffdioxid
$CuSO_4$	Kupfersulfat
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
ddH_20	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle Medium*
DNA	*Deoxyribonucleic Acid*
DTT	Dithiothreitol
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	*epidermal growth factor*
EGFP	*enhanced green fluorescent protein*
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung
ERK	*extracellular signal-regulated kinase*
FAK	*focal adhesion kinase*
FCS	*fetal calf serum*
GAP	*GTPase-activating protein*
GDI	*Guanine nucleotide dissociation inhibitor*

GDP	Guanosindiphosphat
GEF	*Guanine nucleotide exchange factor*
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	*horseradish-peroxidase*
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilo-Dalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
MAPKK	*mitogen-activated protein kinase kinase*
MAPKKK	*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*
mDia	*mammalian Diaphanous*
M	molar (mol/l)
MEK	*mitogen-activated protein kinase kinase*
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MH1/2	*Mad-homology 1/2*
MK	*MAPK-activated protein kinase*
MKK	*MAP kinase kinase homolog*
MLCP	*myosin light chain phosphatase*
mM	millimolar (mmol/l)
MMP	Matrixmetalloprotease
MNK	*MAPK-interacting kinase*
MSK	*mitogen- and stress-activated kinase*
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaN_3	Natriumazid
NBT	4-Nitroblau Tetrazolium Chlorid
NOP	*Nonidet P-40-Puffer*

NP-40	Ethylphenylpolyethylenglycol
PBS	*phosphate buffered saline*
PI3K	*Phosphatidylinositol-3-kinase*
PTHrP	*Parathyroid hormone-releasing peptide*
P160ROCK	*p160 Rho-associated kinase*
Rac	*ras-related C3 botulinum toxin substrate*
Ras	*rat sarcoma viral oncogene homolog*
RBD	*Rho-GTP binding domain*
RhoA	*ras homologue A*
RIPA	*Radioimmunoprecipitation*
RSK	*90-kDa ribosomal S6 kinase*
R-Smad	*regulatory Smad*
SAPK	*stress-activated protein kinase*
SARA	*Smad anchor for receptor activation*
SCID	*severe combined immunodeficient*
SDS	*sodium-dodecyl-sulfat*
SDS-PAGE	*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*
Smad	*Sma/mad related*
Smurf	*Smad-ubiquitination-regulatory factor*
Src	*Rous sarcoma oncogene*
STI	*soybean trypsin inhibitor*
TAK1	*Transforming growth factor-activated kinase 1*
TBS	*Tris-buffered saline*
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGFβ	*transforming growth factor beta*
Thr	Threonin
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan-hydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
Tyr	Tyrosin
WB	*Western Blot*
ZO-1	*zona occludens-1*

1. Einleitung

1.1 Die TGFβ-Familie

Die Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren β (TGFβ) besteht aus mehr als 30 multifunktionellen Zytokinen. Dazu gehören TGFβs, Activine, Inhibine, BMPs und einige weitere Wachstumsfaktoren. TGFβ spielt in vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen eine wesentliche Rolle (Massague, 1998). Dazu zählen die Embryonalentwicklung, das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, die Motilität und die Apoptose. Die am häufigsten beobachtete Reaktion auf eine TGFβ-Stimulation ist eine Wachstumsinhibition. Dennoch spielt TGFβ auch eine wichtige und komplexe Rolle in der Tumorentstehung. Einige Tumoren produzieren vermehrt selbst TGFβ und stimulieren sich somit autokrin. Dabei werden viele Tumoren epithelialer Herkunft resistent gegen die durch TGFβ vermittelte Wachstumshemmung. Bei manchen Tumoren verursacht TGFβ eine epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) (Bhowmick et al., 2001), d.h. ortsständige polarisierte epitheliale Zellen verändern sich in bewegliche, Fibroblasten ähnelnde Zellen (Thiery, 2002). Weiterhin kann dieser Wachstumsfaktor die Invasivität von Tumorzellen erhöhen (Ellenrieder et al., 2001) und das vermehrte Auftreten von Metastasen bewirken (Akhurst et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass TGFβ auf eine Vielzahl von Genen wirkt und deren Expression aktiviert oder inhibiert (Xie et al., 2003; Zavadil et al., 2001).
Bis heute sind die drei Isoformen TGFβ1, TGFβ2 und TGFβ3 bekannt, die in ihrer Basenfolge zu mehr als 70 Prozent übereinstimmen. Die meisten Erkenntnisse liegen über die Isoform TGFβ1 vor. Die bioaktiven Formen der TGFβ-Moleküle kommen als Dimere vor, verbunden durch hydrophobe Wechselwirkungen und Disulfid-Brücken-Bindungen.
Die durch die TGFβ–Isoformen vermittelte Signaltransduktion verläuft über die TGFβ-Rezeptoren. Man unterscheidet den Typ 1, 2 und 3, wobei es sich bei den Typen 1 und 2 um transmembranäre Serin-/Threonin-Kinasen handelt, die sich auch in ihrer Struktur ähneln (Wrana et al., 1992). Es sind sieben unterschiedliche Typ 1-Rezeptoren bekannt (ALK1 bis ALK7), von den Typ 2-Rezeptoren fünf (ActRII, ActRIIb, AMHR, BMPRII und TGFβR2). Der klassische TGFβ-Signalweg verläuft über TGFβ-Rezeptor 2 und ALK5. Die biologische Funktion des Typ 3-Rezeptors, dem die zytoplasmatische Domäne fehlt, ist bis heute noch relativ unklar. In Abwesenheit von Liganden liegen die beiden Rezeptortypen 1 und 2 als Homodimere vor. Die TGFβ-Isoformen binden zuerst an den Typ 2-Rezeptor. Dieser bildet Heterotetramere mit dem Typ 1-Rezeptor und

phosphoryliert diesen an Serin-/Threonin-Resten der GS-Region. Dabei handelt es sich um eine kleine 30 Aminosäuren lange Domäne, die sich direkt neben der Kinasedomäne befindet. Wenn die GS-Region in den phosphorylierten Zustand überführt wird, wird das katalytische Zentrum freigegeben und damit die endogene Kinasefunktion aktiviert (Wrana et al., 1994). Die Tetramere aus den TGFβ-Rezeptoren werden daraufhin an Endosomen gebunden und ins Zytoplasma befördert, wo sie dann nachgeschaltete Signalmoleküle aktivieren können. Diese Translokation des Rezeptorenkomplexes ins Zytoplasma scheint für eine effiziente Signaltransduktion nötig zu sein (Penheiter et al., 2002). Die Komplexe werden jedoch schon nach kurzer Zeit durch Lysosomen abgebaut oder bewegen sich zurück zur Zellmembran, wo die Rezeptor-Dimere bis zur erneuten Aktivierung verbleiben, um dann für eine erneute Signalweiterleitung bereitzustehen (Lutz et Knaus, 2002; Mukherjee et al., 1997).

1.2 Smad-abhängige Signaltransduktion

Zu den am genauesten und ausführlichsten beschriebenen TGFβ-Effektoren zählen die Smad-Proteine (Massague et Chen, 2000), von denen Smad1 bis Smad8 bekannt sind. Bei der TGFβ-Signaltransduktion unterscheidet man die beiden aktivierenden Smad-Proteine 2 und 3 (R-Smads), die die Signalweiterleitung hemmenden Smad6 und Smad7 und das Smad4-Protein.



Abb. 1: Aufbau eines R-Smad (*regulatory Sma/mad related*)-Proteins. Es besteht aus jeweils einer MH1- und MH2 (*Mad homolgy 1 und 2*)-Domäne, verbunden durch die Linker-Region. Bei dem C-terminalen SSXS-Motiv handelt es sich um die Phosphorylierungsstelle, die durch den TGFβ (*transforming growth factor beta*)-Rezeptor 1 aktiviert wird (in Anlehnung nach Massague, 1998).

Während die Proteine Smad1, Smad5 und Smad8 von BMPs und anderen Liganden aktiviert werden, aktiviert TGFβ die Smad-Proteine 2 und 3 (R-Smads), indem er diese an Serin- und Threoninresten am C-terminalen SSXS-Motiv in der so genannten MH2-Domäne phosphoryliert (Abb. 1).

Diese R-Smads bilden dann mit dem Mediator Smad4 Heterodimere und bewegen sich als aktivierte Smadkomplexe in den Kern. (Abb. 2).

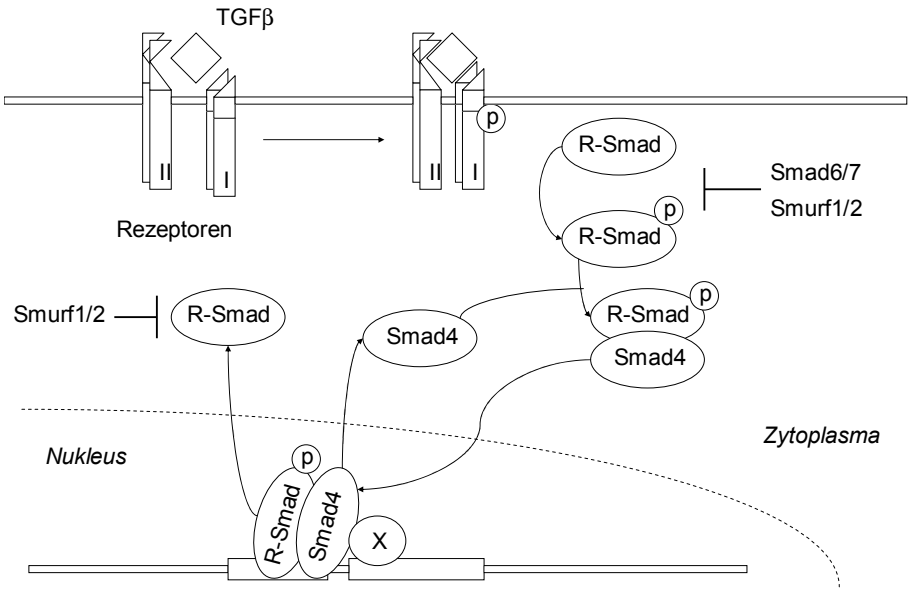

Abb. 2: Mechanismus der TGFβ (*transforming growth factor beta*)-Rezeptor- und Smad (*Sma/mad related*)-Aktivierung in der Zelle. Weitere beteiligte Mediatoren sind DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren oder Repressoren. Sie sind zur Vereinfachung symbolisch als (X) dargestellt (in Anlehnung nach Derynck et Zhang, 2003).

Zu den die TGFβ-Signalweiterleitung fördernde Faktoren zählen Endosomen (Panopoulou et al., 2002), die PI3K (*Phosphotidylinositol-3-kinase*) (Bakin et al., 2000) und SARA (*Smad anchor for receptor activation*) (Tsukazaki et al., 1998). Dagegen hemmen Smad6 und Smad7 die Aktivierung, indem sie mit Ihrer MH2-Domäne an den Typ1-Rezeptor binden und somit die Bindungsstelle der R-Smads besetzen (Abb. 2). Weiterhin hemmend auf die Signalweiterleitung wirken die Smurf-Proteine 1 und 2 (*Smad-ubiquitination-regulatory factor*) (Abb. 2), indem sie die Ubiquitinierung von R-Smads induzieren. Bei diesem Vorgang wird das 76 Aminosäuren lange Peptid Ubiquitin an Proteine gebunden und markiert sie so für deren Degradation, also für ihren Abbau durch zelleigne Enzyme (Weissman, 2001).

Wird die MH2-Domäne der R-Smads phosphoryliert, können Heterodimere mit Smad4 gebildet werden. Weiterhin können an der MH2-Domäne DNA-bindende Proteine angreifen. Erreicht der Komplex den Zellkern, nehmen sowohl die MH2-Domäne, als auch die am anderen Ende des Moleküls liegende MH1-Domäne an der DNA-Bindung des

Komplexes teil (Abb. 1) und regulieren mit Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren oder Repressoren die Transkription von Zielgenen (Abb. 2).

Die zwischen den beiden Domänen gelegene Linker-Region dient als Angriffspunkt von MAP-Kinasen (Funaba et al., 2002) und kann von diesen phosphoryliert werden (Massague, 1998). MAP-Kinasen sind aber auch fähig, die MH1-Domäne zu phosphorylieren und die Translokation von Smads in den Kern zu verhindern (Kretzschmar et al., 1999). Es ist jedoch auch beschrieben, dass Kinasen wie z. B. JNK (*c-Jun amino-terminal kinase*) (Engel et al., 1999) oder ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) (Funaba et al., 2002) Smads phosphorylieren und deren Translokation in den Kern fördern. Die Wirkung der verschiedenen MAP-Kinasen auf den Smad-Signalweg ist also sehr komplex.

1.3 Smad-unabhängige Signaltransduktion

Neben den Smads kann TGFβ auch andere Signalkaskaden innerhalb sehr kurzer Zeit aktivieren. Dazu zählen die Familie der MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) (Massague, 2000), die Familie der kleinen Rho-GTPasen mit ihren Mitgliedern RhoA, Rac und Cdc42 (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002) und die PI3K mit ihrem Effektor Akt (Bakin et al., 2000) (Abb. 3).

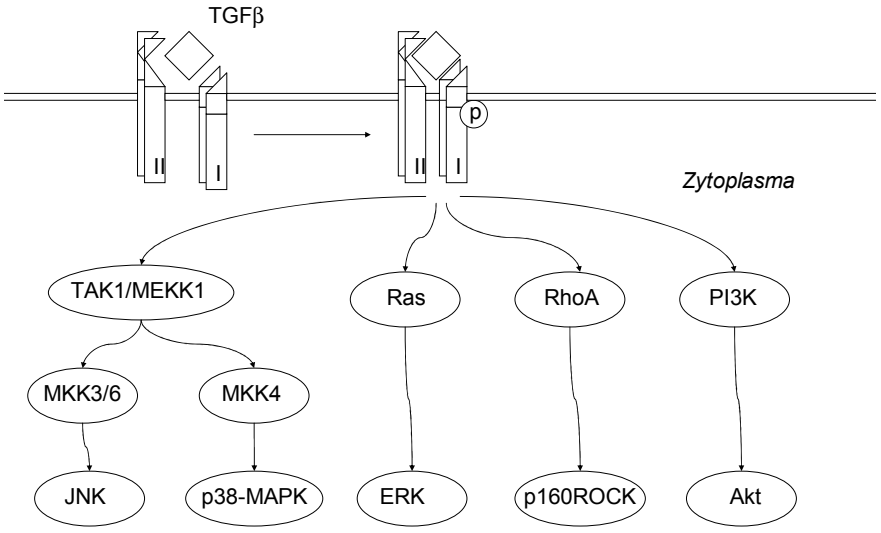

Abb. 3: TGFβ (*transforming growth factor beta*)-Signaltransduktion über Smad (*Sma/mad related*)-unabhängige Wege. Der aktivierte Rezeptorkomplex kann unterschiedliche Effektoren wie MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinase*), GTPasen (Guanosintriphosphat-spaltende Enzyme) oder die PI3K (*Phosphatidylinositol-3-kinase*) stimulieren (verändert nach Derynck et Zhang, 2003).

Von der Familie der Rho-GTPasen sind nach dem heutigen Wissensstand bei Säugetieren 20 Mitglieder bekannt (Raftopoulou et Hall, 2004). Sofern diese Signalmoleküle GTP gebundenen haben, sind sie aktiv. Im angeregten Zustand können sie mit Zielproteinen interagieren und damit eine Vielzahl von zellulären Effekten bewirken (Bishop et Hall, 2000). Wird das GTP durch die endogene GTPase zu GDP hydrolysiert, fällt das Molekül in den inaktiven Zustand zurück. Die am besten beschriebene Wirkung der GTPasen ist die Regulation des Aktinzytoskelettes. Rho beeinflusst den Aufbau von kontraktilen Aktin-Myosin-Filamenten, während Rac und Cdc42 die Polymerisation von Aktinfilamenten, welche Lamellipodien und Filopodien bilden, steuern. Darüber hinaus fördern alle drei GTPasen die Bildung von Integrin-basierten Adhäsionskomplexen (Nobes et Hall, 1995; Ridley et Hall, 1992; Ridley et al., 1995) und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Zellmigration. Während Cdc42 vor allem für die Herstellung der Zellpolarität benötigt wird, können alle drei GTPasen Einfluss auf die Struktur des mikrotubulären Zytoskeletts nehmen und die Transkription bestimmter Gene modulieren (Etienne-Manneville et Hall, 2002). Der GTPase-Zyklus wird von drei Gruppen von Proteinen reguliert. Die GEFs bewirken den Austausch von GDP durch GTP und aktivieren damit die GTPase. Dahingegen verstärken die GAPs die intrinsische GTPase-Aktivität. Die GDIs verhindern den Austausch von GDP durch GTP und hemmen somit die Signalweiterleitung (Moon et Zheng, 2003; Schmidt et Hall, 2002; Zheng, 2001). Extrazelluläre Signale scheinen ihre Einflüsse vor allem über GEFs auf GTPasen auszuüben. Bis heute sind mehr als 40 Effektoren, 50 GEFs und 40 GAPs der Rho-Familie bekannt.

Während Rac und Cdc42 an der Frontseite von migrierenden Zellen benötigt werden (Nobes et Hall, 1995), scheint Rho vor allem für die Bildung von fokalen Adhäsionen und für die Kontraktilität von Zellkörpern wichtig zu sein. Beides ist für die gerichtete Migration von Zellen essentiell. Die beiden Rho-Effektoren p160ROCK und mDia führen zur Polymerisation des monomeren G-Aktins zum filamentösen F-Aktin und damit zu einer Stabilisation von Mikrofilamenten (Watanabe et al., 1999; Sumi et al., 2001). p160ROCK phosphoryliert die Myosin-bindende Untereinheit der MLCP und erhöht damit die Menge an phosphoryliertem Myosin (Kawano et al., 1999), was eine Zunahme an kontraktiler Kraft zur Folge hat. Dies erleichtert am hinteren Teil von migrierenden Zellen die Trennung von der extrazellulären Matrix (Mitchinson et Cramer, 1996). Neben der viel beachteten Regulation des Aktinzytoskeletts steuert Rho auch den Umbau des Tubulinzytoskeletts (Wittmann et Waterman-Storer, 2001), das für die Stabilisierung der Zellpolarität und somit für eine effiziente Migration über längere Strecken unabdingbar ist.

Rho stabilisiert über seinen Effektor mDia das Mikrotubulusskelett, indem dieser direkt mit den Mikrotubuli interagiert (Ishizaki et al., 2001).

Zu den möglichen Effektoren von Rho-GTPasen gehört die Familie der MAP-Kinasen. Bis heute sind fünf unterschiedliche Gruppen von MAP-Kinasen bei Säugetieren bekannt. Dies sind die ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1 und 2*), JNK1, 2 und 3 (die *c-Jun amino-terminal kinases 1, 2 und 3*), die p38 mit ihren Isoformen α, β, γ, δ, die ERK3 und 4 (*extracellular signal-regulated kinases 3 und 4*), sowie die ERK5 (*extracellular signal-regulated kinase 5*) (Chen et al., 2001; Kyriakis et Avruch, 2001). Die MAPKs können von einer Vielzahl an Stimuli aktiviert werden. Die ERK1 und ERK2 werden vor allem von Wachstumsfaktoren und Phorbol-Estern durch Phosphorylierung an dem Thr-Glu-Tyr-Motiv aktiviert, während die JNK und p38 Kinasen eher durch osmotischen Schock, ionisierende Strahlung oder Zytokine an den Motiven Thr-Gly-Thr, bzw. Thr-Pro-Tyr aktiviert werden (Pearson et al., 2001). Jede MAPK-Familie besteht aus drei Kinasen, die den im Signalweg weiter unten liegenden Effektor aktivieren: einer MAPK, einer MAPKK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) und einer MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) (Abb. 4).

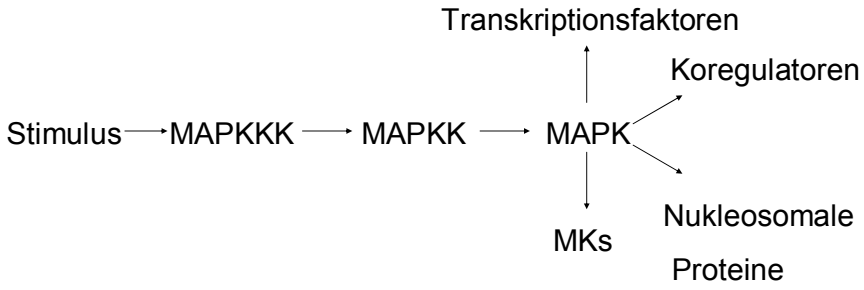

Abb. 4: Prinzip der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalkaskade. Stimuli wie zellulärer Stress, Zytokine und Wachstumsfaktoren führen zur Aktivierung nachgeschalteter Effektoren.

Die MAPKKKs, bei denen es sich um Serin-/Threonin-Kinasen handelt, werden oft durch Phosphorylierung und/oder als Folge der Interaktion mit einem Mitglied der kleinen GTP-bindenden Proteine der Rho-/Ras-Familie als Folge extrazellulärer Stimulation aktiviert (Dan et al., 2001; Kolch, 2000). Die wohl bekannteste MAPK-Familie ist die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade. Die Effektoren der MAPKs sind Transkriptionsfaktoren, nukleosomale Proteine, Koregulatoren der Transkription und die MKs (*MAPK-activated protein kinases*) (Edmunds et Mahadevan, 2004). Zur Familie der MKs gehören die RSKs (*90-kDa ribosomal S6 kinases*), die MSKs (*mitogen- and stress-activated kinases*), die

MNKs (*MAPK-interacting kinases*), die MK2 und MK3 (MAPK-*activated protein kinases 2 und 3*) und die MK5 (*MAPK-activated protein kinase 5*) (Roux et Blenis, 2004).

TGFβ kann ERK-, JNK- und p38-MAPK- (Hanafusa et al., 1999) Signalwege aktivieren. Eine Aktivierung mit langsamer Kinetik (Ellenrieder et al., 2001) kann ein Ergebnis der Smad-abhängigen Transkription sein, jedoch spricht die beobachtete Aktivierung innerhalb von fünf bis 15 Minuten für einen anderen Signalweg, der nicht auf den Weg über den Zellkern angewiesen ist (Massague et Chen, 2000). Versuche mit Smad4-defizienten Zellen oder dominant-negativen Smads demonstrieren, dass die Aktivierung der MAPK JNK durch TGFβ unabhängig von den Smad-Proteinen ist (Engel et al., 1999). Dem TGFβ-Rezeptor TβRImL45, der aufgrund einer Mutation Smads nicht binden kann, ist es dennoch möglich die p38-MAPK zu aktivieren (Yu et al., 2002).

1.4 Das Zytoskelett und Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion

Zellen sind über Desmosomen und Zonulae adhaerentes miteinander verbunden. Die Desmosomen bewirken eine Vernetzung des Intermediärskeletts und schaffen somit mechanische Festigkeit. Die Zonulae adhaerentes nutzen die Verbindung zum Aktinzytoskelett, um Zell-Zell-Verbindungen herzustellen und die dynamische Adhäsion sowohl während der Embryonalentwicklung (Perez-Moreno et al., 2003), als auch bei adulten Zellen bereitzustellen. An der Verbindung verschiedener Zellen miteinander (Zonulae adhaerentes) und an der Verbindung zur extrazellulären Matrix (Punktdesmosomen, bzw. fokale Adhäsionen) sind eine Vielzahl an Proteinen beteiligt.

Die Zell-Zell-Verbindungen werden von Cadherinen, bei epithelialen Zellen vor allem von E-Cadherin, einem 120 kD großen Protein vermittelt (Gumbiner, 1996). Dieses bindet mit seiner extrazellulären Domäne Ca^{2+}-abhängig die extrazellulären Domänen anderer E-Cadherine. Intrazellulär ist E-Cadherin an β-Catenin gebunden, das über α-Catenin die Verbindung zum Aktinzytoskelett, das aus 5 nm kleinen Mikrofilamenten aufgebaut ist, herstellt (Abb. 5). An der Verbindung von α-Catenin zum Aktinzytoskelett sind weitere Proteine wie α-Aktinin oder Vinculin beteiligt (Gumbiner, 2000).

Die Verbindung des Zellskeletts zur extrazellulären Matrix verläuft über Vinculin und Talin, die wiederum an Integrine gebunden sind, die im direkten Kontakt zu Proteinen der extrazellulären Matrix stehen (Abb. 5). Diese Verbindungen werden als Hemidesmosomen, bzw. als fokale Adhäsionen oder auch als fokale Kontakte bezeichnet (Zamir et Geiger, 2001).

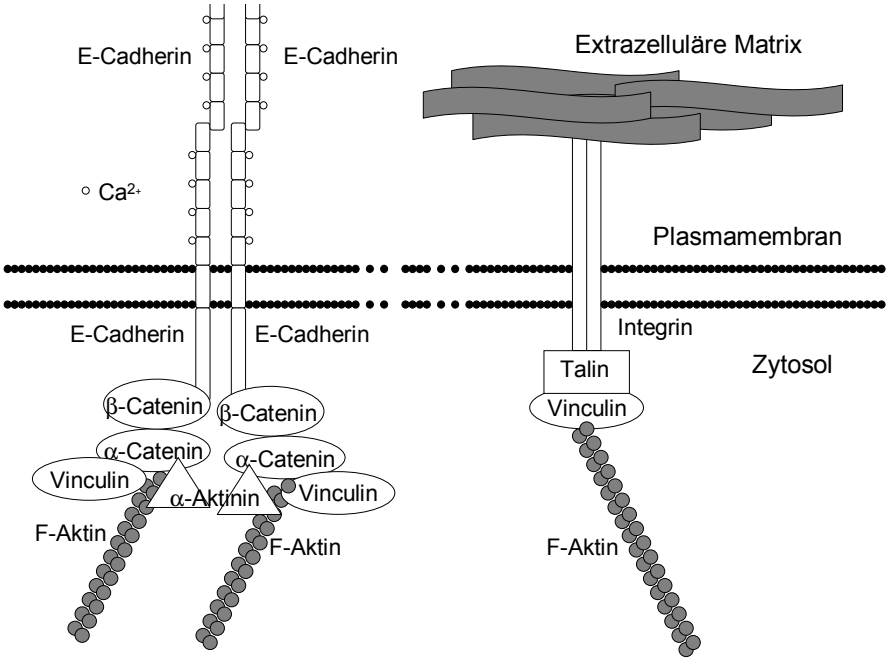

Abb. 5: Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen des Aktinzytoskeletts. Bei Zell-Zell-Verbindungen, den Zonulae adhaerentes (links) wird das Aktinzytoskelett zweier Zellen über E-Cadherine verbunden. Verbindungen des Aktinzytoskeletts mit der extrazellulären Matrix (rechts), die fokalen Kontakte werden über Integrine vermittelt. Dazwischengeschaltet sind diverse Proteine, die am Aufbau der Verbindungen beteiligt sind.

1.5 Die Bedeutung von TGFβ für die epitheliale Transdifferenzierung

Die Metastasierung von bösartigen Tumoren ist ein maßgeblicher Grund für das Versterben von Krebspatienten. Gewissheit für die metastasierungsfördernde Rolle von TGFβ wurde bei Studien an nierentransplantierten Patienten erlangt, die unter immunsuppressiver Therapie mit Cyclosporin hochmaligne Gesichtstumoren entwickelten (Hojo et al., 1999). Man entdeckte, dass die erhöhte Inzidenz von aggressiven Neoplasien bei mit Cyclosporin behandelten Patienten wahrscheinlich auf das von den Zellen autonom produzierte TGFβ zurückgeht. Bei SCID- (*severe combined immunodeficient*) Mäusen, denen sowohl T-, als auch Natürliche-Killer-Zellen fehlen, verhinderte die Gabe von Antikörpern gegen TGFβ die durch Cyclosporin stimulierte Zunahme von Metastasen nach Injektion von A549-Adenokarzinomzellen. Weil den Mäusen die beiden Arten von Killerzellen fehlen, nahm man an, dass dies nicht durch die Immunsuppression selbst, sondern durch einen zelleigenen Effekt zustande kommen musste. Diese Interpretation wurde durch die Tatsache untermauert, dass die A549-Zellen *in vitro* morphologische Umwandlungen, die für invasive Zellen typisch sind, nach Cyclosporin-Zugabe vollzogen.

Durch die Zugabe eines Antikörpers gegen TGFβ konnte diese Veränderung vollständig verhindert werden (Hojo et al., 1999). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass TGFβ ein Haupteffektor für die Metastasierung von Mammakarzinomzellen ist (Yin et al., 1999). Wenn die TGFβ-Signaltransduktion in MDA-MB-231-Zellen durch Transfektion einer dominant-negativen TGFβ-Rezeptor 2-Mutante gehemmt wurde, kam es nach Injektion in SCID-Mäuse im Vergleich zu den Mäusen, denen Zellen mit intaktem TGFβ-Rezeptor 2 injiziert wurden, zu einer geringeren Anzahl an Tumoren, weniger Knochenmetastasen und zu einem längeren Überleben der Tiere. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass TGFβ1 die Produktion von PTHrP (*Parathyroid hormone-releasing peptide*) induziert, das Osteoklasten aktiviert und die Reabsorption von Kalzium im Nierentubulus fördert. Hiermit wurde eine bedeutende Erkenntnis gewonnen, da Patientinnen mit PTHrP-positivem Mammakarzinom mit höherer Wahrscheinlichkeit an Metastasen erkranken als Patientinnen mit PTHrP-negativem Mammakarzinom (Yin et al., 1999).

Eine Veränderung der Zellen von dem fest verankerten, ortsständigen epithelialen Typ in einen sich bewegenden, invasiven, mesenchymalen Typ wird als epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung bezeichnet. Es kommt zu einem Umbau des Aktinzytoskeletts, einer verringerten Expression von Adhäsions- und Zytoskelettmolekülen (E-Cadherin, ZO-1 und Keratin) und zu einer erhöhten Expression des mesenchymalen Zellmarkers Vimentin. Diese Effekte von TGFβ konnten in diversen Zelllinien gezeigt werden, so in normalen und transformierten epithelialen Brustdrüsenzellen (Hosobuchi et Stampfer, 1989; Miettinen et al., 1994; Oft et al., 1996; Bhowmick et al., 2001), Spinaliomzellen (Portella et al., 1998), Adenosarkomzellen (Kitagawa et al., 1996), Pankreaskarzinomzellen (Ellenrieder et al., 2001) und anderen. Teilweise produzieren Tumorzellen selbst TGFβ und stimulieren sich damit autokrin (Derynck et al., 1987). Werden dominant-negative TGFβ-Rezeptoren in Zellen transfiziert, verlieren diese die Fähigkeit zur EMT (Miettinen et al., 1994; Oft et al., 1998; Portella et al., 1998), was die Fähigkeit Tumoren zu bilden verringerte. Bei der Kolonkarzinomzelllinie CT 26, die sich durch einen hohen Metastasierungsgrad auszeichnet, konnte ein transfizierter dominant-negativer TGFβ-Rezeptor 2 sogar zu einer kompletten Verhinderung von Metastasen führen (Oft et al., 1998). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass TGFβ und sein TGFβ-Rezeptor 2 die Invasivität und Metastasierung von Tumoren verstärken können. Der Mechanismus der TGFβ-induzierten EMT ist sehr komplex. Dabei spielen neben dem klassische Smad-

Signalweg (Piek et al., 1999; Ellenrieder et al., 2001) auch Ras/PI3K- und MAPK-Signalwege (Iglesias et al., 2000; Santibanez et al., 2000; Ellenrieder et al., 2001; Zavadil et al., 2001; Bakin et al., 2002; Yu et al., 2002), sowie interessanterweise auch eine Smad-unabhängige RhoA-Aktivierung eine Rolle (Bhowmick et al., 2001).

1.6 Fragestellung

Der Wachstumsfaktor TGFβ hat eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte auf Zellen. Einige Tumoren zeigen Defekte in diesem Signalweg, die zur Entstehung von bösartigen Erkrankungen beitragen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von TGFβ auf die Aktivität von Signalmolekülen, die als Regulatoren des Zytoskeletts bekannt sind, bei Smad4-defizienten und Smad4-kompetenten humanen epithelialen Zelllinien zu analysieren und miteinander zu vergleichen. Weiterhin sollten die morphologisch erkennbaren Veränderungen des Aktin- und Tubulinzytoskeletts nach TGFβ-Stimulation untersucht werden.

Zu Beginn mussten Smad4-defiziente und Smad4-kompetente Zelllinien humaner Herkunft identifiziert werden.

Zu den zu untersuchenden Signalmolekülen gehörten die GTPase RhoA und die beiden MAP-Kinasen ERK1/2 und p38, die alle drei als Beteiligte an der Regulation des Zytoskeletts beschrieben sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Tabelle 1: Erstantikörper

Antikörper	**Hersteller (Bestellnummer)**	**Antikörper-verdünnung**
Anti-β-Aktin	Sigma (A5441)	WB: 1:5000
Anti-β-Catenin	Sigma (C2206)	IF: 1:500
Anti-E-Cadherin	BD Transduction Laboratories (610182)	IF: 1:100
Anti-ERK (pan ERK)	BD Transduction Laboratories (610123)	WB: 1:5000
Anti-p38α/SAPK2a	BD Transduction Laboratories (612168)	WB: 1:2500
Anti-Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling Technology (#9211)	WB: 1:1000
Anti-Phospho-p42/44 MAP Kinase (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology (#9101)	WB: 1:2000 IF: 1:1000
Anti-RhoA	Santa Cruz Biotechnology (sc-418)	WB: 1:500
Anti-Smad2/3	BD Transduction Laboratories (610842)	WB: 1:500
Anti-Smad4	BD Transduction Laboratories (610934)	WB: 1:500
Anti-TGFβ-Rezeptor 1	Santa Cruz Biotechnology (sc-398)	WB: 1:1000
Anti-TGFβ-Rezeptor 2	Santa Cruz Biotechnology (sc-400)	WB: 1:500
Anti-α-Tubulin	Sigma (T5168)	IF: 1:5000
Anti-Vinculin	Sigma (V9131)	IF: 1:500

Abkürzungen: ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; IF: Immunfluoreszenz; MAP Kinase: *mitogen-activated protein kinase*; RhoA: *ras homologue A*; SAPK: *stress-activated protein kinase*; Smad: *Sma/mad related*; TGFβ: *transforming growth factor beta*; Thr: Threonin; Tyr: Tyrosin; WB: *Western Blot*.

Tabelle 2: Zweitantikörper

Antikörper	Hersteller (Bestellnummer)	Gekoppelt mit	Antikörper-verdünnung
Maus IgG	Sigma (A-3562)	alkalische Phosphatase	WB 1:5000
Maus IgG	Pierce (31340)	Meerrettichperoxidase	WB 1:5000
Maus IgG	Sigma (A-4416)	Meerrettichperoxidase	WB 1:5000
Maus IgG	Dianova (115-165-044)	Cy3	IF: 1:1000
Maus IgG	Molecular Probes (A-11001)	Alexa 488	IF: 1:1000
Kaninchen IgG	Dianova (211-055-109)	Alkalische Phosphatase	WB: 1:5000
Kaninchen IgG	Sigma (A-6154)	Meerrettichperoxidase	WB: 1:5000
Kaninchen IgG	Pierce (31460)	Meerrettichperoxidase	WB: 1:5000
Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology (#7074)	Meerrettichperoxidase	WB: 1:5000
Kaninchen IgG	Dianova (111-166-045)	Cy3	IF: 1:1000
Kaninchen IgG	Molecular Probes (A-11008)	Alexa 488	IF: 1:1000

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G; IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot.

2.1.2 Protease- und Phosphataseinhibitoren

2.1.2.1 Proteaseinhibitoren (Stammlösungen):

Aprotinin	1 mM	(Bayer)
Leupeptin	2,3 mM	(Roche)
PefaBloc	100 mM	(Roche)
STI (*soybean trypsin inhibitor*)	0,5 mM	(Roche)

2.1.2.2 Phosphataseinhibitoren (Stammlösungen):

β-Glycerophosphat	40 mM	(Sigma)
Natriumorthovanadat	500 mM	(Sigma)
Natriumpyrophosphat	40 mM	(Fluka)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in höchster erhältlicher Reinheit von den Firmen Appli Chem, Fluka, Merck, Roth und Sigma bezogen.

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und autoklaviert, bzw. steril filtriert.

Alkalischer	50 mM	Tris-HCl
Phosphatasepuffer:	50 mM	$MgCl_2$
	→ auf einen pH-Wert von 9,4 eingestellt	
Antikörperverdünnungslösung:	0,3 % BSA in 1 x CMF-PBS	
Antikörperverdünnungslösung	2 %	BSA
für den Nachweis der	0,1 %	Tween
Phosphorylierung von Kinasen:	in 1 x TBS pH 7,4	
CMF-PBS (1 x):	140 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	KH_2PO_4
	10 mM	NaH_2PO_4
	→ auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt	
Elektrophoreselaufpuffer (1 x):	0,05 M	Tris-HCl
	1,05 M	Glycin
	0,1 %	SDS
Elutionspuffer für an Membranen	0,2 M	Glycin
gebundene Antikörper:	0,5 M	NaCl
	→ auf einen pH-Wert von 2,8 eingestellt	
Elvanol:	20 g	Mowiol 4-88
	→ in 80 ml CMF-PBS pH 7,3 gelöst	
	40 ml	Glycerin
	1 %	NaN_3

Nährlösung für Zellkultur:	„Dulbecco´s modified Eagle Medium“	
	10 %	FCS
	1 %	L-Glutamin
	1 %	nicht essentielle Aminosäuren
NOP-Lysepuffer (1 x):	10 mM	Tris-HCl pH 7,8
	150 mM	NaCl
	1 %	NP-40
	2 mM	EDTA
	2 mM	EGTA

PBS mit Kalzium und Magnesium:

Lösung 1:	140 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	8 mM	Na_2HPO_4
	1,5 mM	KH_2PO_4
	→ in 800 ml ddH_2O gelöst	
Lösung 2:	1 mM	$CaCl_2$
	→ in 100 ml ddH_2O gelöst	
Lösung 3:	0,5 mM	$MgCl_2$
	→ in 100 ml ddH_2O gelöst	
	→ die drei Lösungen zusammen ergeben einen pH-Wert von 7,2	

Proteinprobenpuffer	0,2 M	Tris-HCl
Stammlösung:	1 M	Saccharose
	5 mM	EDTA
	0,2 %	Bromphenolblau
	→ Lösung wurde auf einen pH-Wert von 8,8 eingestellt; zu 250 µl Stammlösung wurden unmittelbar vor Gebrauch 50 µl 10 % SDS und 20 mg DTT hinzugefügt	

Proteintransferpuffer (1 x):	25 mM	Tris
	1,5 %	Glycin
	0,1 %	SDS
	20 %	Methanol
RIPA-Puffer (1 x):	1 %	Triton X-100
	0,5 %	Natrium-Desoxycholat
	0,1 %	SDS
	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 7,2
	10 mM	EDTA
	10 mM	EGTA
RIPA-Puffer (1 x) für den	50 mM	Tris-HCl, pH 7,2
Nachweis der Phosphorylierung	150 mM	NaCl
von Kinasen:	1 %	Triton X-100
	0,1 %	SDS
	0,5 %	Natrium-Desoxycholat
RIPA-Puffer (1 x) für Rho-Assay:	50 mM	Tris-HCl, pH 7,2
	500 mM	NaCl
	10 mM	$MgCl_2$
	1 %	Triton X-100
	0,5 %	Natrium-Desoxycholat
	0,1 %	SDS
TBS-Puffer (1 x):	10 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	→ auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt	
Waschpuffer (1 x) für Rho-	50 mM	Tris-HCl, pH 7,2
Assay (Rho-RBD-Waschpuffer):	150 mM	NaCl
	10 mM	$MgCl_2$
	1 %	Triton X-100

2.1.4 Geräte

Fluoreszenzmikroskop, DMRIB	(Leica)
Gelelektrophoresekammer, SDS-PAGE	(Sigma)
Immunoblot Transferkammer	(Sigma)

2.1.5 Zelllinien

Tabelle 3: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle
BxPc-3	humanes Pankreaskarzinom	ATCC Nr. CRL-1687
HEK-293	humane embryonale Nierenzellen	ATCC Nr. CRL-1573
MCF-7	humanes Mammakarzinom	ATCC Nr. HTB-22
MDA-MB-468	humanes Mammakarzinom	ATCC Nr. HTB-132
MIA PaCa-2	humanes Pankreaskarzinom	ATCC Nr. CRL-1420
NIH/3T3	Mausfibroblasten	ATCC Nr. CRL-1658
PANC-1	humanes Pankreaskarzinom	ATCC Nr. CRL-1469
PC-3	humanes Prostatakarzinom	ATCC Nr. CRL-1435
SW480	humanes Kolonkarzinom	ATCC Nr. CCL-228

Abkürzungen: ATCC: *American Type Culture Collection.*

Die drei Zelllinien BxPc-3, MIA PaCa-2 und PANC-1 wurden aus Tumoren des Pankreas gezüchtet.

Die aus einer Biopsie des Pankreaskorpus gewonnen Vorläuferzellen der BxPc-3 zeigten in der pathologisch-histologischen Untersuchung die Eigenschaften eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms (Tan et al., 1986). Die Tumorzellen, aus denen die

PANC-1-Zelllinie hervorging, stammten aus einem Operationspräparat des Pankreaskopfes eines 56-jährigen Mannes. In der feingeweblichen Untersuchung erkannte man ein undifferenziertes Karzinom (Lieber et al., 1975). Bei den Ursprungszellen der MIA PaCa-2 handelte es sich um ein undifferenziertes Karzinom. Dieses wurden bei einer explorativen Laparatomie aus einem großen Oberbauchtumor eines 65 Jahre alten Patienten gewonnen (Yunis et al., 1977).

Die Nierenzelllinie HEK-293 stammt von embryonalen Nierentubuluszellen ab. Diese Epithelien wurden durch DNA-Fragmente des Adenoviruses Typ 5 transformiert. Daraus wurde die erste durch Viren transformierte humane Zelllinie gewonnen (Graham et al., 1977).

Die Vorläufer der beiden Zelllinien MCF-7 (Brooks et al., 1973) und MDA-MB-468 (Cailleau et al., 1978) wurden aus malignen Pleuraergüssen bei Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinomen gewonnen. Sie zeigten in der histologischen Untersuchung Adenokarzinome, die als gut (MCF-7) bzw. gering differenziert (MDA-MB-468) beschrieben wurden.

Die Zelllinie NIH/3T3 wurde aus Mausembryonenkulturen hergestellt. Es handelt sich um Fibroblasten, die eine ausgeprägte Kontaktinhibition des Wachstums zeigen (Jainchill et al., 1969).

Die SW480-Zelllinie stammt von einem primären Adenokarzinom des Kolons eines 50-jährigen Mannes ab (Leibovitz et al., 1976).

Aus einem Operationspräparat wurden die PC-3-Zellen gewonnen. Sie stammten aus einer Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms. Histologisch handelte es sich um ein gering differenziertes Adenokarzinom (Kaighn et al., 1979).

2.1.6 Sonstiges

ECL-Western Blot Detektionskit	(Pierce)
Nitrozellulose BA 85	(Schleicher und Schüll)
Zellkulturmaterialien	(Falcon, Becton-Dickinson)

Molekulargewichtsstandards für Proteine:

Precision Plus Protein Standards (10-250 kD)	(BIO RAD 161-0373)
Low Molecular Weight Range (6,5-66 kD)	(Sigma M3913)
Wide Molecular Weight Range (31-205 kD)	(Sigma M4038)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37 °C und mit einem CO_2-Anteil von 10 % in „*Dulbecco's modified Eagle Medium*" (DMEM) unter Zugabe von 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % L-Glutamin und 1 % nicht essentiellen Aminosäuren in 75 cm^2-Flaschen kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Zellen, die eine Konfluenz von 80 bis 100 % erreicht hatten, wurden vereinzelt. Das Wachstumsmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit CMF-PBS unter Zusatz von je 2,5 mM EDTA und EGTA für zwei Minuten gewaschen. Die Chelatkomplexbildner binden Ca^{2+} und Mg^{2+} im Interzellulärraum, und schwächen somit die Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion. Daraufhin wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (Gibco) für fünf bis zehn Minuten überschichtet. Die Serin-Protease Trypsin spaltet Proteine an Serinresten und löst somit die Anheftung der Zellen an den Kulturflaschen und Zell-Zell-Verbindungen. Die abgelösten Zellen wurden mit Wachstumsmedium vermischt, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 200 xg drei Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und die Zellen in 4 bis 6 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die verschiedenen Zelllinien wurden im Verhältnis 1:4 bis 1:10 auf neue Flaschen mit vorgelegtem Medium verteilt oder für Immunoblot-Analysen in 60 mm oder 100 mm Schalen ausgesät. Für Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden die Zellen auf Deckgläschen in 30 mm Schalen verteilt.

2.2.2 Herstellung von Proteinlysaten

Die Zellen wurden mit NOP- oder verschiedenen RIPA-Puffern aufgearbeitet. Die Puffer unterscheiden sich durch die verwendeten Detergenzien. Während bei der NOP-Aufarbeitung Proteinkomplexe weitgehend erhalten bleiben, lösen sich diese bei Benutzung von RIPA-Puffern zumeist in Einzelproteine auf.

Die Zelllinien wurden in Nährlösung gezüchtet. Nachdem sie eine Konfluenz von 80 bis 100 % erreicht hatten, wurden sie in DMEM ohne Zusatz von FCS für 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Stimulation mit 15 µg/ml TGFβ1. Als Positivkontrolle zur Bestimmung der p38-MAPK-Aktivität wurde eine 300 mM Sorbitolkonzentration für 30 Minuten verwendet (Han et al., 1994). Durch die Hyperosmolarität im Extrazellulärraum und dem konsekutiven osmotischen Stress für die Zellen kommt es zu einer verstärkten Aktivierung dieser Proteinkinase. Um die Aktivierung der p42/44-MAPK durch TGFβ1 zu

untersuchen, wurde als Kontrolle eine EGF-Konzentration von 100 ng/ml gewählt. EGF ist als potenter ERK1/2-Aktivator bereits beschrieben (Cooper et al., 1984).

Zu Beginn der Aufarbeitung wurden die Zellen mit 4 °C kaltem CMF-PBS, bzw. TBS gewaschen, daraufhin mit ebenfalls 4 °C kaltem Lysispuffer überschichtet. Dieser war je nach Aufarbeitungsart mit verschieden Proteaseinhibitoren (NOP- und RIPA-Puffer: 1 mM Pefabloc, 5 µM STI, 5 µM Aprotinin und 10 µM Leupeptin; RIPA-Puffer für den Nachweis von Phosphorylierungen: 10 µM Leupeptin und 5 µM Aprotinin; RIPA-Puffer für Rho-Assay: 10 µM Leupeptin, 5 µM Aprotinin und 1 mM Pefabloc) versetzt, um zu verhindern, dass Proteine durch die bei der Auflösung von Zellmembranen aus Lysosomen freigesetzten Proteasen degradiert wurden. Zur Untersuchung der Phosphorylierung von Proteinen, wurden Phosphataseinhibitoren (2 mM Natriumorthovanadat, 10 mM Natriumpyrophosphat, 25 mM β-Glycerophosphat) zugegeben, die die Aktivität endogener Phosphatasen hemmen. Nach einigen Sekunden Inkubation mit dem Puffer wurden die Zellen mit einem Gummischaber abgekratzt und in Dounce-Glashomogenisatoren mit 15-20 Zügen zerkleinert. Die entstandene Suspension wurde in einem Reaktionsgefäß bei 4 °C zehn Minuten bei 13000 xg zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die gelösten Proteine befanden, wurde abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Die gesamte Aufarbeitung wurde auf Eis bei 4 °C durchgeführt.

2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mit der BCA (Bicinchoninic Acid)-Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten erfolgte spektralphotometrisch nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz. Es kam ein Kit der Firma Sigma (Nr. BCA-1) zur Anwendung. Dabei wurden jeweils 5 µl des Lysats mit ddH_20 im Verhältnis 1:10 verdünnt, und zu dieser Lösung jeweils 1 ml Farbreagenz, bestehend aus 50 Teilen „*Bicinchoninic Acid*"-Lösung und einem Teil 4 %-iger $CuSO_4$-Lösung, gegeben. Die Proben wurden gemischt, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert um die Reaktion zu starten, und schließlich zehn Minuten bei 4 °C wieder gekühlt, um die Reaktion zu terminieren.

Der Test basiert auf folgendem Prinzip: Die Polypeptidketten reagieren mit den Hydroxyionen der zugegebenen Lauge, die ihnen Wasserstoffionen entziehen. Dadurch erhalten die Peptide eine negative Ladung. Gibt man nun Kupferionen hinzu, bilden sich sofort doppelt negativ geladene Kupfer-Protein-Komplexe aus und führen zu einer

Violettfärbung und konsekutiv zu einer Zunahme der Absorption. Je mehr Protein in der Probe vorhanden ist, desto größer ist später die Absorption bei der Messung.
Als Bezugswerte wurden Lösungen mit festgelegten Konzentrationen (0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml Protein) aus BSA und ddH_20 hergestellt. Bei diesen Proben wurde wie bei den Lysatproben nun die Absorption bei einer Wellenlänge von λ= 562 nm bestimmt.
Trägt man nun die gemessene Absorption auf der x-Achse und die Proteinkonzentration der Bezugswerte auf der y-Achse eines Diagramms auf, kann man anhand der entstandenen Ursprungsgeraden mit der gemessenen Absorption der Lysatproben deren Proteinkonzentration bestimmen. Es wurden pro Lysat zwei Proben gemessen und aus den beiden Proteinkonzentration der arithmetische Mittelwert bestimmt.

2.2.4 Rho-Assay

Um die Effekte der TGFβ1-Stimulation auf die Aktivität von RhoA zu untersuchen, wurde ein bereits beschriebener Versuchsansatz ausgewählt (Ren et Schwartz, 2000). Dabei macht man sich zunutze, dass Effektoren von Rho nur an dieses binden, wenn es GTP gebunden hat, also aktiv ist. Hierzu wurde die Rho-Bindungsdomäne des Effektors Rhotekin als GST-Fusionsprotein verwendet. Das GST-Fusionsprotein wurde an *Gluthation-Sepharose-Beads* gebunden und in *Aliquots* zu 200 µg von PD Dr. Klaudia Giehl aus der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie zur Verfügung gestellt.
Die für den Rho-Assay benötigten Zelllysate wurden wie in 2.2.2 beschrieben hergestellt. Daraufhin wurden je nach verwendeter Zelllinie 2 bis 3 mg Protein in 500 µl RIPA-Puffer für Rho-Assay gegeben, hiervon 30 µg als Beladungskontrolle abgenommen und pro Ansatz 25 µg GST-Rhotekin zugegeben. Die Inkubation erfolgte 45 Minuten bei 4 °C in einem Überkopfmischer. Dabei wurde das GTP-gebundene Rho von dem Fusionsprotein spezifisch gebunden. Nun wurde das Pellet viermal in Rho-RBD-Waschpuffer gewaschen und mit einer 50-µl-Hamilton-Spritze trocken gesaugt. Anschließend wurde zu jeder Probe 30 µl SDS-Probenpuffer gegeben, und diese für zehn Minuten bei 95 °C erhitzt. Die so eluierten Proteine wurden wie die Beladungskontrollen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Im Anschluss wurde ein Elektrotransfer auf Nitrozellulose durchgeführt.

2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei dieser Methode werden Proteingemische mithilfe des negativ geladenen Detergenz SDS, das die Eigenladungen der Proteine maskiert, in einer Acrylamidmatrix

ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurde die eindimensionale SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Dies ist eine Ventrikelapparatur, die aus zwei 6 x 8 cm großen Glasplatten aufgebaut ist. Zwischen diesen befindet sich eine 1 mm dicke Gelmatrix.

Je höher der Acrylamidanteil der Lösung ist, desto genauer können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Für kleinere Proteine wurden höher konzentrierte Gele, für größere geringer konzentrierte Gele verwendet.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Acrylamidgele

	Trenngel 10 % (4,8 ml)	Trenngel 12 % (4,8 ml)	Sammelgel 7,5 % (3 ml)
30 % Acrylamid	1,6 ml	2,0 ml	0,38 ml
2 % Bisacrylamid	0,65 ml	0,8 ml	0,15 ml
Tris-HCl (3 M, pH 8,8)	0,6 ml	0,6 ml	-
Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	-	-	0,38 ml
SDS 10 % ig	48 µl	48 µl	30 µl
Saccharose 60 % ig	-	-	0,75 ml
ddH_20	1,9 ml	1,3 ml	1,3 ml
TEMED	2 µl	2 µl	5 µl
APS	30 µl	30 µl	30 µl
Trennbereiche (kD)	30-100	20-80	

Abkürzungen: APS: Ammoniumpersulfat; ddH_20: doppelt destilliertes Wasser; kD: Kilo-Dalton; M: molar; SDS: *Sodiumdodecylsulfat*; TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin; Tris-HCl: Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid.

Zunächst wurde die Trenngellösung gut durchmischt und zwischen die zwei mit Alkohol gereinigten und abgedichteten Glasplatten bis ungefähr 2 cm unterhalb der oberen Glaskante gegossen. Zum Schutz gegen Austrocknung wurden die Gele mit Wasser überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von mindestens zwei Stunden wurde das überstehende Wasser entfernt und der Gelrand mit einem Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde die Sammelgellösung durchmischt und bis zur Oberkante der Glasplatten eingefüllt. Mithilfe eines Kammes wurden Taschen für die verschiedenen Proben hergestellt.

Die Quervernetzung des Acrylamids erfolgte durch Bisacrylamid. Als Katalysator dieser Reaktion kam TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) zum Einsatz. Um die Reaktion zu starten, wurde APS (Ammoniumpersulfat) zugegeben.

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mit 1/3 Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für zehn Minuten erhitzt. Das im Puffer enthaltene SDS führt durch Aufspaltung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Die Thiolverbindungen Mercaptoethanol und Dithiothreitol spalten die Disulfidbrücken zwischen den Molekülen.

Die so behandelten Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen gegeben. Um die Größe der einzelnen Proteine bestimmen zu können, wurden Proteinstandards verwendet. Zuerst wurden die Proben im Sammelgel bei 80 V und maximal 400 mA fokussiert und dann im Trenngel bei 140 V und maximal 400 mA aufgetrennt.

2.2.6 Immunoblot

Für die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran kam ein Blot mit folgendem Aufbau zum Einsatz:

Anodengitter, Faserpolster, Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Trenngel, Filterpapier, Faserpolster, Kathodengitter. Vor dem Aufbau des Blots wurden Faserpolster, Filterpapiere, Trenngel und Nitrozellulosemembran zehn Minuten in Transferpuffer gewaschen. Anschließend wurde der Blot in die Tankblot-Kammer eingesetzt und mit Transferpuffer überschichtet. Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren über eine Dauer von zwölf Stunden bei einer Spannung von 20 V und einer Stromstärke von maximal 150 mA. Hierdurch wanderten die negativ geladenen Proteine von der Kathode zur Anode und wurden somit aus dem Trenngel auf die Nitrozellulose übertragen.

2.2.7 Ponceaurotfärbung von Nitrozellulosemembranen

Zur Beurteilung der Effizienz des Proteintransfers wurden die Nitrozellulosemembranen zuerst mit ddH_2O gewaschen und dann mit Ponceaurot reversibel angefärbt. Bei gelungenem Proteintransfer ließen sich die Proteinbanden gleichmäßig und scharf anfärben. Die Banden der Referenzproteine wurden mit Kugelschreiber markiert, die Blots zurechtgeschnitten und mit CMF-PBS, bzw. TBS wieder vollständig entfärbt.

2.2.8 Immunfärbung

Um die gesuchten Proteine auf der Nitrozellulose nachzuweisen, wurden die Immunoblots in einer Lösung eines spezifischen Antikörpers, der gegen das zu analysierende Antigen gerichtet ist, inkubiert.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurden die Blots zuerst in CMF-PBS mit 5 % Magermilch für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurde der Blot kurz in CMF-PBS gewaschen, um dann mit dem ersten Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (2.1.1) in CMF-PBS mit 0,3 % BSA bei 4 °C über Nacht inkubiert zu werden. Am nächsten Tag wurde der Blot einmal mit CMF-PBS mit 0,02 % Tween und zweimal mit CMF-PBS für je zehn Minuten gewaschen. Je nachdem mit welcher Färbemethode (2.2.9, 2.2.11) die gesuchten Proteine nachgewiesen werden sollten, wurden unterschiedliche Zweitantikörper (gekoppelt mit den Enzymen Meerrettichperoxidase oder Alkalische Phosphatase) in der angegebenen Verdünnung (2.1.1) verwendet.

Um die Phosphorylierung von Proteinen zu untersuchen, wurden zuerst die freien Bindungsstellen der Membran mit 5 % Magermilchpulver in TBS abgesättigt. Nach kurzem Waschen mit TBS wurde der gegen die phosphorylierte Form eines Proteins gerichtete 1. Antikörper in 2 % BSA + 0,1 % Tween in TBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal in 2 % BSA + 0,1 % Tween in TBS für zehn Minuten gewaschen. Daraufhin wurde der mit HRP-gekoppelte 2. Antikörper (2.1.1) wiederum in 2 % BSA + 0,1 % Tween in TBS für eine Stunde auf den Blot gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit 2 % BSA + 0,1 % Tween in TBS und einmaligem Spülen mit TBS erfolgte die Detektion durch Chemolumineszenz.

2.2.9 Proteindetektion durch Chemolumineszenz

Bei der ECL- (*enhanced chemiluminescence*) Entwicklung erfolgt der Nachweis des gesuchten Proteins durch einen Zweitantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet und mit dem Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist. Durch die Enzymtätigkeit wird das im Kit enthaltene Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert und in einen energiereicheren Zustand überführt. Unter Photoemission wird der Grundzustand wieder erreicht. Die ausgesandten Photonen schwärzen dabei den Röntgenfilm und markieren indirekt das gesuchte Protein auf der Membran.

Zur Detektion des Proteins wurden die zwei ECL-Reagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt. In der entstandenen Lösung wurde der Blot fünf Minuten inkubiert. Danach wurde das

überschüssige Reagenz mit einem Papiertuch abgesaugt, und die Membran auf einer Glasplatte mithilfe einer Frischhaltefolie fixiert. Durch das Auflegen eines Röntgenfilms konnte die durch die Reaktion entstandene Lichtemission festgehalten werden.
Die Belichtungszeit variierte zwischen wenigen Sekunden und einer Stunde.

2.2.10 Elution gebundener Antikörper

Diese Methode dient der Loslösung gebundener Antikörper von Antigenen, um die Membran für weitere Proteinnachweise nutzen zu können. So wurde die Gesamtmenge an p38-MAPK und p42/44-MAPK nach der Bestimmung des Phosphorylierungsgrades dieser Kinasen bestimmt.
Zu Beginn wurde die Membran kurz in TBS gewaschen. Darauf folgte eine zweistündige Inkubation mit dem Elutionspuffer. Nach zweimaligem Waschen mit ddH_2O und einmaligem Waschen mit TBS für je zehn Minuten, wurden unspezifische Bindungen mit 5 % Magermilchpulver in TBS abgesättigt. Nun war eine erneute Behandlung mit Erstantikörpern möglich.

2.2.11 Proteindetektion durch alkalische Phosphatase

Die alkalische-Phosphatase-Entwicklung stellt ein weitere Färbemethode dar. Sie wurde bei dieser Arbeit verwendet, um Membranen mit weiteren Antikörpern anzufärben, bei denen zuvor mit der Chemolumineszenzmethode Proteine nachgewiesen worden waren. Bei dieser Detektionsmethode ist das Enzym alkalische Phosphatase an den Zweitantikörper (2.1.1) gekoppelt.
Nach zweimaligem Waschen für je zehn Minuten mit CMF-PBS, bzw. TBS nach der ECL-Entwicklung, folgten zwei Waschschritte für je zehn Minuten mit alkalischem Phosphatasepuffer. Zur Entwicklung der Blots wurden drei Teile NBT (30 mg 4-Nitroblau Tetrazolium Chlorid, gelöst in 1 ml 70 % N,N-dimethylformamid) und drei Teile BCIP (15 mg 5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat, gelöst in 1 ml 100 % N,N-dimethylformamid) mit 100 Teilen alkalischem Phosphatasepuffer gemischt. Mit dieser Färbelösung wurde die Membran bis zum Sichtbarwerden der gesuchten Banden im Dunkeln inkubiert. Dieser Methode liegt folgende Reaktion zugrunde: Das Enzym alkalische Phosphatase katalysiert die Abspaltung eines Phosphatrestes von BCIP. Das so entstandene Indoxylderivat wird durch NBT oxidiert und sorgt für eine bläuliche Anfärbung auf dem Blot. Diese wird durch das ebenfalls blaue, reduzierte NBT verstärkt. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Membran mit Wasser gewaschen, da dies durch eine Erniedrigung

des pH-Wertes die Reaktion stoppte. Nun wurde die noch feuchte Membran direkt eingescannt.

2.2.12 Immunfluoreszenzfärbung

Mit der Immunfluoreszenzfärbung kann die Lokalisation verschiedener Proteine in der Zelle bestimmt werden. Dafür wurden 10^5 Zellen auf Deckgläschen in 30 mm Schalen ausgesät. Sie wurden in Wachstumsmedium bei 37 °C und 10 % CO_2 gezogen, bis sie eine Konfluenz von 70 bis 80 % erreicht hatten. Nach Stimulation wurden sie mit 4 °C kaltem PBS mit Ca^{++} und Mg^{++} kurz gewaschen und dann entweder mit einer -20 °C kalten Lösung aus 50 % Azeton und 50 % Methanol für 20 Minuten oder mit einer 4 °C kalten 4 % igen Paraformaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Nach kurzem Waschen mit CMF-PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer 3 % igen BSA-Lösung in CMF-PBS für eine Stunde abgeblockt. Darauf folgte wiederum ein Waschdurchgang mit CMF-PBS. Nun wurde jedes Deckglas mit 100 µl einer 0,3 % igen BSA-Lösung mit dem Erstantikörper (2.1.1) für eine Stunde inkubiert. Daran schlossen sich ein Waschschritt mit CMF-PBS und 0,01 % Tween und zwei zehnminütige Waschschritte mit CMF-PBS an. Der Zweitantikörper gekoppelt mit Alexa-488 oder Cy3 wurde ebenfalls in der Antikörperverdünnungslösung für eine Stunde mit dem Deckgläschen inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen für jeweils zehn Minuten. Nun wurden die Deckgläschen mit ddH_2O gespült, um Salzniederschläge zu verringern. Schließlich wurden die Deckgläschen auf einem Objektträger mit Elvanol fixiert. Nach ein bis drei Tagen Aushärten des Elvanols konnten die Objektträger mit dem Fluoreszenzmikroskop DMRIB von Leica betrachtet und die Lokalisation der Proteine analysiert werden. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm Analysis von Soft Imaging System. Bei einigen Versuchen wurde eine Kerngegenfärbung mit dem mit der DNA interkalierenden Reagenz DAPI in einer Verdünnung von 1:5000 durchgeführt. Das Aktinzytoskelett wurde mit dem Reagenz Phalloidin Alexa-488 in einer Verdünnung von 1:300 angefärbt. Dabei verbindet sich das aus dem Knollenblätterpilz Amanita phalloides gewonnene Gift mit den F-Aktin-Filamenten und vernetzt diese (Wulf et al., 1979). Durch Koppelung des Phalloidin mit einem Fluorochrom ist nun das Aktinzytoskelett analysierbar.

2.2.13 Statistik

Für jedes Ergebnis wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis abgebildet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung epithelialer Zelllinien

3.1.1 TGFβ-Rezeptoren

Die Effekte, die TGFβ bewirkt, werden über TGFβ-Rezeptoren in die Zellen weitergeleitet (Massague, 1998; Lutz et al., 2002). Man unterscheidet die für die Signalweiterleitung verantwortlichen TGFβ-Rezeptoren 1 und 2. Darüber hinaus sind noch zwei weitere akzessorische Rezeptoren (TGFβ-Rezeptor 3, bzw. Betaglycan (Lopez-Casillas et al., 1991) und Endoglin (Gougos et al., 1990)) bekannt.

In dieser Arbeit wurden zunächst verschiedene Zelllinien auf ihre qualitative Ausstattung mit den beiden TGFβ-Rezeptoren untersucht. Dies erfolgte anhand von Immunoblots.

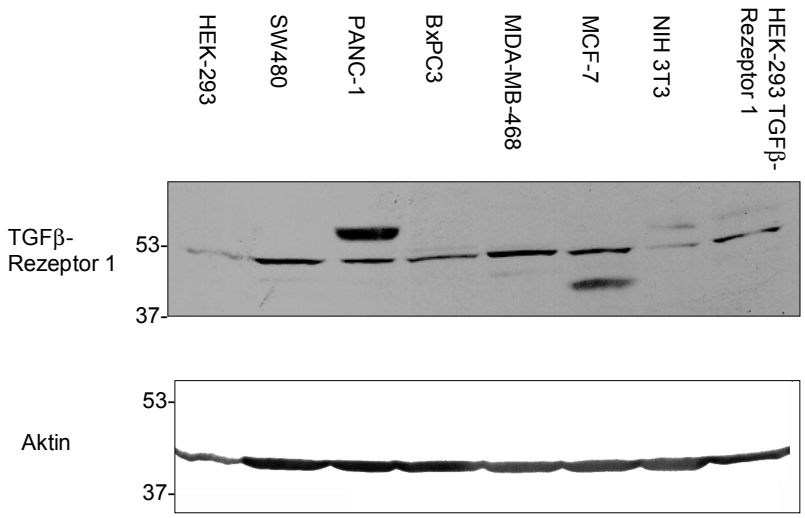

Abb. 6: Vergleichender Nachweis von TGFβ (*transforming growth factor beta*)-Rezeptor 1 in verschiedenen Zelllinien. 100 µg Protein aus NOP (*Nonidet P-40-Puffer*)-Gesamtzelllysaten wurde im zehnprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen den TGFβ-Rezeptor 1 dargestellt. Eine gleichmäßige Beladung wurde mit einer Aktinfärbung kontrolliert.

In Abb. 6 erkennt man, dass alle untersuchten Zelllinien den TGFβ-Rezeptor 1 besitzen, dessen Größe mit 53 kD beschrieben ist (Massague, 1998). Bei den größeren und kleineren Proteinen, die ebenfalls zur Darstellung kommen, könnte es sich sowohl um

Abbauprodukte, Komplexbildungen mit anderen Proteinen oder auch um alternative Splice-Varianten handeln. Als Positivkontrolle wurden Typ 1-Rezeptor transfizierte HEK-293-Zellen, die in unserer Arbeitsgruppe hergestellt wurden, verwendet.

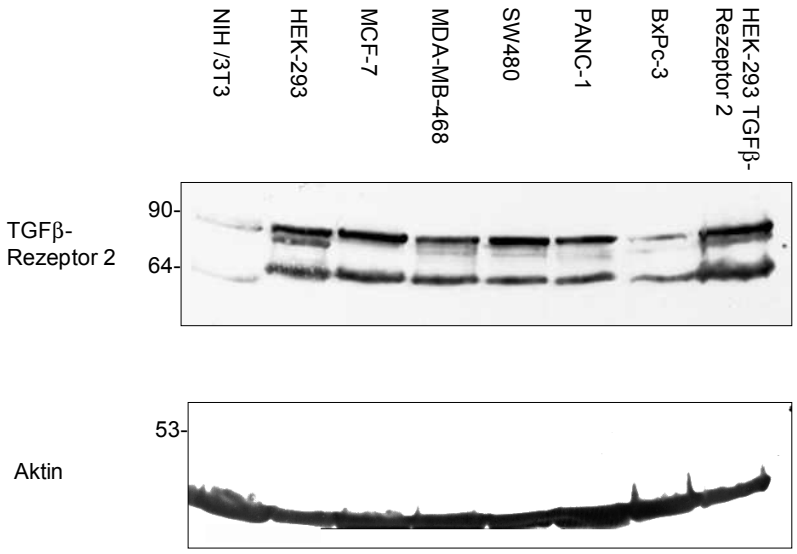

Abb. 7: Vergleichender Nachweis von TGFβ (*transforming growth factor beta*)-Rezeptor 2 in verschiedenen Zelllinien. 60 µg Protein aus NOP (*Nonidet P-40-Puffer*)-Gesamtzelllysaten wurde im zehnprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen den TGFβ-Rezeptor 2 dargestellt. Eine gleichmäßige Beladung wurde mit einer Aktinfärbung kontrolliert.

Daraufhin wurde der TGFβ-Rezeptor 2 in diversen Zelllinien nachgewiesen (Abb. 7). Seine Größe beträgt 70 kD (Massague, 1998). Man erkennt bei einem Molekulargewicht von ca. 90 kD eine zweite Bande. Hierbei handelt es sich am ehesten um einen Komplex aus den Typ 1- und 2-Rezeptoren. Die analog zu Abb. 6 durchgeführte Positivkontrolle zeigt ebenso vermehrt Rezeptoren in mit dem Typ 2-Rezeptor transfizierten HEK-293-Zellen. Die geringere Größe der TGFβ-Rezeptoren bei den NIH/3T3-Zellen im Vergleich zu Zellen humaner Herkunft, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass diese Zelllinie aus Mausfibroblasten gewonnen wurde und somit das Molekül einen geringfügig anderen Aufbau besitzt.

Es konnte also gezeigt werden, dass bei allen untersuchten Zelllinien die beiden TGFβ-Rezeptoren auf Proteinebene nachweisbar sind.

3.1.2 Smad-Proteine

Die Smad-Proteine sind die bekanntesten und bislang am besten beschriebenen TGFβ-Effektoren. Es sind acht verschiedene Mitglieder dieser Familie bekannt, wovon Smad2 und Smad3 durch den TGFβ-Rezeptor 1 aktiviert werden. Sie werden an zwei Serinresten am C-terminalen Ende phosphoryliert und bilden mit Smad4 Komplexe, die daraufhin in den Kern wandern, wo sie die Transkription von Genen regulieren.

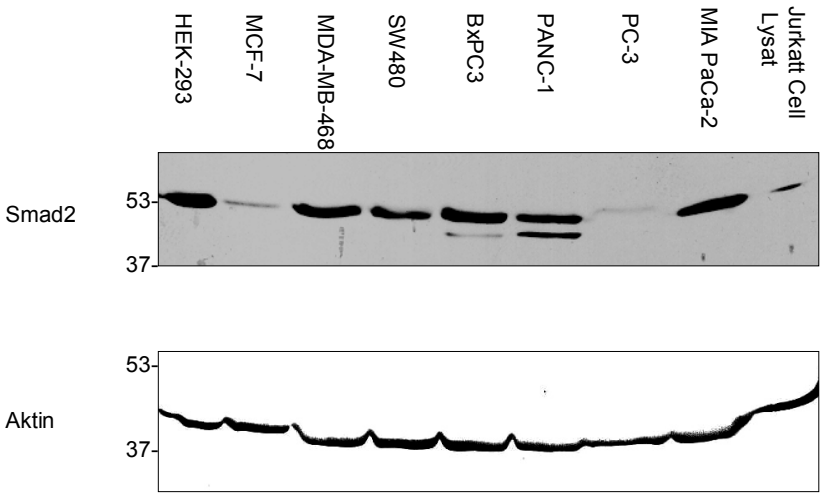

Abb. 8: Vergleichender Nachweis von Smad2 (*Sma/mad related 2*) in verschiedenen Zelllinien. 60 µg Protein aus NOP (*Nonidet P-40-Puffer*)-Gesamtzelllysaten wurde im zehnprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen Smad2 dargestellt. Eine gleichmäßige Beladung wurde mit einer Aktinfärbung kontrolliert.

In allen untersuchten Zelllinien war Smad2 nachweisbar (Abb. 8). Im Verhältnis zu den anderen Zelllinien war die Menge an Smad2-Protein in den Zelllinien MCF-7 und PC-3 gering. Die Positivkontrolle (Jurkatt Cell Lysat) wurde vom Hersteller des Antikörpers (BD Transduction) geliefert und zeigte die Größe der gesuchten Proteine von 58 kD an.
Vom Mediator-Protein Smad4 ist bekannt, dass dessen Expression in einigen Tumoren (Pankreas, Mamma und Kolon) durch Mutation verloren gegangen ist. So wurden zwei Mammakarzinomzelllinien (MCF-7 und MDA-MB-468) und die HEK-293-Zellen auf die Expression von Smad4 untersucht. Als Kontrolle wurde ein HEK-293-Klon unserer Arbeitsgruppe verwendet, der mit EGFP-Smad4 transfiziert worden war.

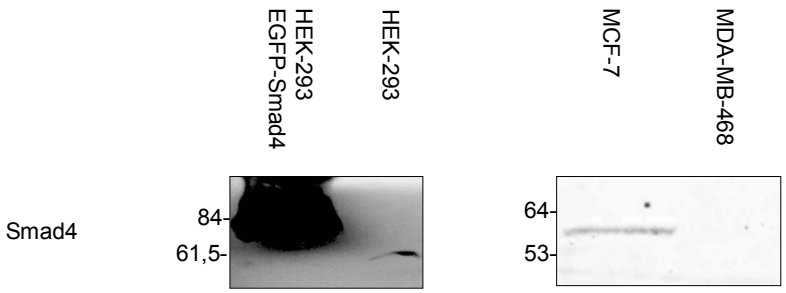

Abb. 9: Nachweis von Smad4 (*Sma/mad related 4*) in verschiedenen Zelllinien. 200 µg (60 µg in der Positivkontrolle) aus RIPA (*Radioimmunoprecipitation*)-Gesamtzelllysaten wurden im zehnprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen Smad4 dargestellt.

Es zeigte sich (Abb. 9), dass HEK-293- und MCF-7-Zellen Smad4 auf Proteinebene besitzen. MDA-MB-468-Zellen exprimieren jedoch kein Smad4-Protein.

3.2 TGFβ1-Stimulation

Neben dem bereits ausführlich untersuchten Smad-abhängigen Signalweg scheint TGFβ auch bei Smad4-defizienten, sowie bei mit dominant-negativen Smads transfizierten Zellen Signale übertragen zu können. Studien zeigten, dass neben MAPK (Engel et al., 1999; Yu et al., 2002) auch GTPasen wie Rho, Rac oder Cdc42 (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002) aktiviert werden können. Anhand der vorausgegangen Versuche wurden drei Zelllinien ausgewählt, bei denen die TGFβ1-Wirkung auf diese Signalmoleküle untersucht werden sollte. In den Western Blots in Abb. 9 zeigte sich, dass die MDA-MB-468-Zellen Smad4 defizient waren. Dies stimmt mit bereits beschriebenen Ergebnissen überein (de Winter et al., 1997; Xie et al., 2002). So wurden neben der Smad4-defizienten Zelllinie MDA-MB-468, die MCF-7- und HEK-293-Zellen für weitere Untersuchungen verwendet, die das Smad4-Genprodukt exprimieren.

3.2.1 TGFβ1-induzierte Aktivierung von RhoA

Rho-GTPasen spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen. Sie interagieren im aktiven Zustand mit diversen Effektoren und leiten Signale für Zellfunktionen wie den Zytoskelett- und Membranumbau, Gentranskription,

Zellzyklusregulation und Apoptose weiter (Hall, 1998; Bishop et Hall, 2000; Raftopoulou et al., 2004). TGFβ beeinflusst die Funktion von RhoA (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002). Um die Auswirkungen von TGFβ1 auf den Aktivitätszustand von RhoA untersuchen zu können, wurden zu Beginn die Gesamtmengen an RhoA in ausgewählten Zelllinien bestimmt.

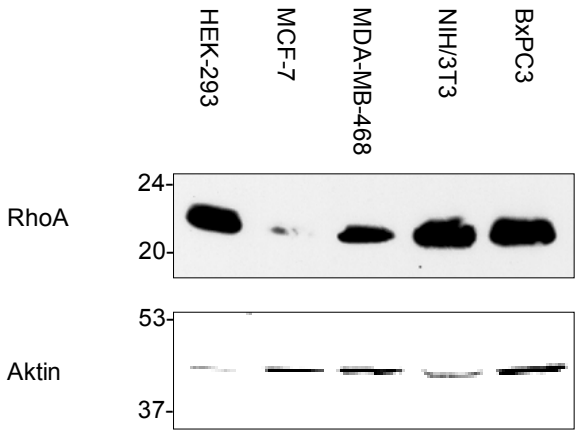

Abb. 10: Nachweis von RhoA (*ras homologue A*) in verschiedenen Zelllinien. 50 µg Protein aus NOP (*Nonidet P-40-Puffer*)-Gesamtzelllysaten wurde im zwölfprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen RhoA dargestellt. Eine gleichmäßige Beladung wurde mit einer Aktinfärbung kontrolliert.

Es zeigte sich, dass in allen Zelllinien RhoA vorhanden war (Abb. 10), wobei die Gesamtmenge in MCF-7-Zellen deutlich geringer als in den MDA-MB-468- und HEK-293-Zellen war. Für die folgenden *Pull-down*-Versuche wurde daher die einzusetzende Menge an Gesamtprotein für die MCF-7-Gesamtzelllysate auf 3 mg und für die MDA-MB-468- und die HEK-293-Zellen auf 2 mg festgelegt.

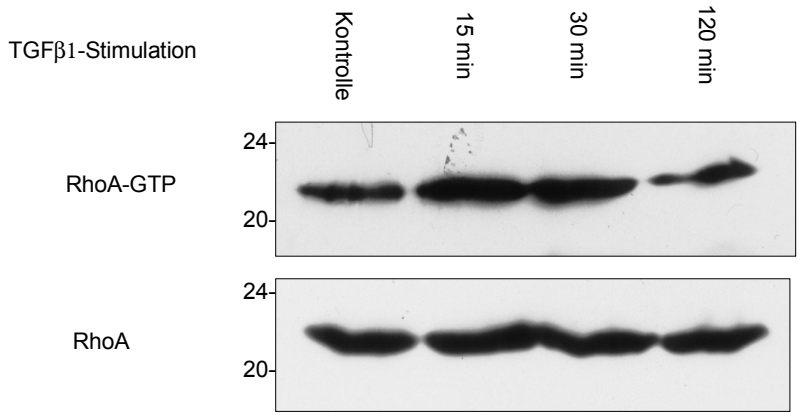

Abb. 11: Bestimmung der Menge an RhoA (*ras homologue A*)-GTP (Guanosintriphosphat) in HEK-293-Zellen nach TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*)-Stimulation. Mit 2 mg Protein aus RIPA (*Radioimmunoprecipitation*)-Gesamtzelllysaten wurde ein RhoA-Pull-down-Versuch durchgeführt, das Eluat im zwölfprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen RhoA dargestellt. Als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinmenge wurden 30 µg RIPA-Gesamtzelllysat aus jedem Ansatz im zwölfprozentigen SDS-PAGE aufgetrennt und die Menge an RhoA im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper dargestellt.

Nach TGFβ1-Stimulation kam es bei der HEK-293-Zelllinie zu einer Zunahme an GTP-gebundenem RhoA, also zu einer Aktivitätssteigerung im Vergleich zum Kontrollwert.
Dieser Effekt wurde 15 Minuten nach Stimulation beobachtet, dauerte nach 30 Minuten noch an und ging nach 120 Minuten wieder auf den Ursprungswert zurück (Abb. 11).
Daraufhin wurde die Wirkung von TGFβ1 auf die RhoA-Aktivität in den beiden aus Mammakarzinomen hervorgegangen Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 untersucht.

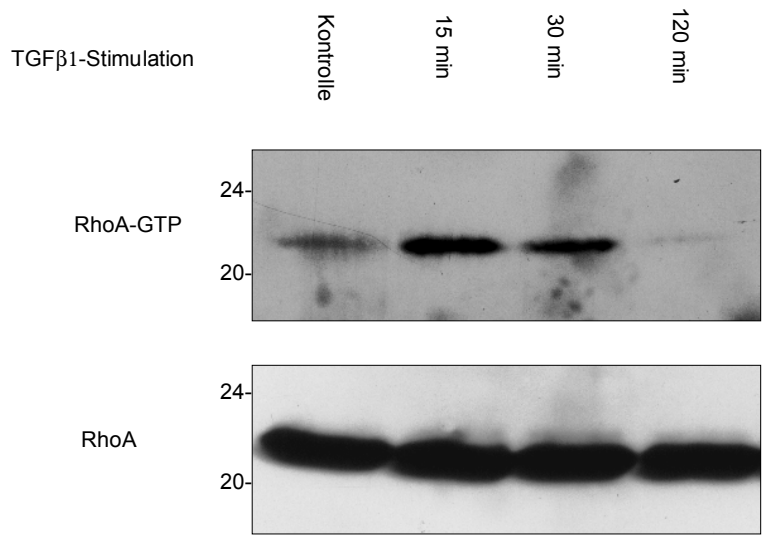

Abb. 12: Bestimmung der Menge an RhoA (*ras homologue A*)-GTP (Guanosintriphosphat) in MCF-7-Zellen nach TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*)-Stimulation. Mit 3 mg Protein aus RIPA (*Radioimmunoprecipitation*)-Gesamtzelllysaten wurde ein RhoA-Pull-down-Versuch durchgeführt, das Eluat im zwölfprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen RhoA dargestellt. Als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinmenge wurden 30 µg RIPA-Gesamtzelllysat aus jedem Ansatz verwendet.

Bei den MCF-7-Zellen zeigte sich eine ähnliche TGFβ1-Wirkung wie bei den HEK-293. Es kam zu einer Zunahme an GTP-gebundenem RhoA nach 15 Minuten, die nach 30 Minuten rückläufig war und nach 120 Minuten den Ursprungswert wieder erreichte (Abb. 12). Der hier abgebildete Rückgang der Aktivität nach 120 Minuten unter den Kontrollwert ist als nicht spezifisch zu erachten.

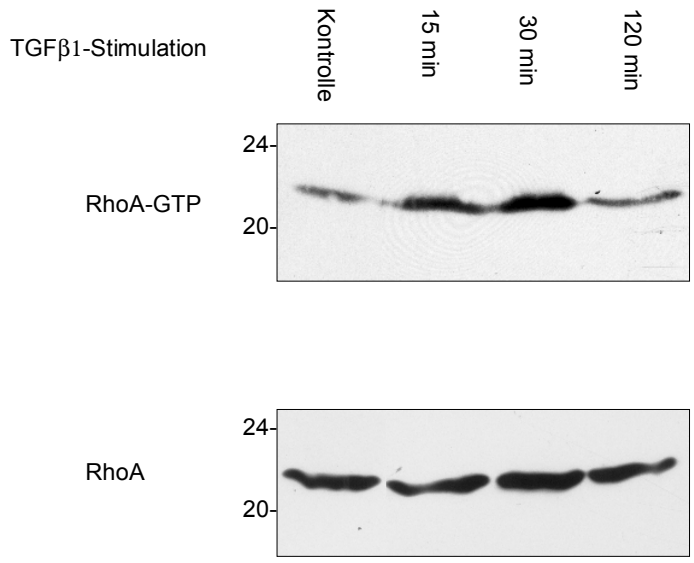

Abb. 13: Bestimmung der Menge an RhoA (*ras homologue A*)-GTP (Guanosintriphosphat) in MDA-MB-468-Zellen nach TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*)-Stimulation. Mit 2 mg Protein aus RIPA (*Radioimmunoprecipitation*)-Gesamtzelllysaten wurde ein RhoA-Pull-down-Versuch durchgeführt, das Eluat im zwölfprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen RhoA dargestellt. Als Gesamtmengenkontrolle wurden 30 µg RIPA-Gesamtzelllysat aus jedem Ansatz verwendet.

Auch bei den MDA-MB-468-Zellen zeigte sich die bei den vorherigen Versuchen beobachtete Reaktion auf die TGFβ1-Stimulation (Abb. 13): Zunahme der GTP-Beladung 15 und 30 Minuten nach Stimulation, anschließend ein Abfall auf den Kontrollwert nach 120 Minuten.

Zusammenfassend konnte in allen drei Zelllinien eine Zunahme der RhoA-Aktivität nach Stimulation mit TGFβ1 beobachtet werden. Dieser Effekt ist bei 15 und 30 Minuten zu erkennen, wobei das Maximum bei den MCF-7- und HEK-293-Zellen bei 15 Minuten, und bei den MDA-MB-468-Zellen bei 30 Minuten liegt. Nach 120 Minuten ging die gesteigerte Aktivität bei allen drei Zelllinien wieder auf den Ursprungswert zurück. Diese Aktivierung kam sowohl in Zelllinien zur Darstellung, die das Genprodukt Smad4 (HEK-293 und MCF-7) exprimieren, als auch in einer Zelllinie (MDA-MB-468), die dieses nicht exprimiert (de Winter et al., 1997; Xie et al., 2002). So scheint es einen Signalweg zu geben, der RhoA aktiviert, und unabhängig von Smad4 ist.

3.2.2 TGFβ1-Einfluss auf die Aktivierung der p38-MAPK

Die MAP-Kinasen sind eine große Familie von Signalmolekülen. In dieser Arbeit wurde unter anderem der Einfluss von TGFβ1 auf den Aktivitätsgrad der p38-MAPK untersucht. Wie bei den beiden verwandten Molekülen ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) und JNK (*c-jun NH_2-terminal kinase*) wird die p38-MAPK durch eine Phosphorylierung an einem bestimmten Abschnitt ihrer Aminosäuresequenz aktiviert. In ihrem Fall handelt es sich um das Thr-Gly-Tyr-Motiv. Werden die Threonin- und Tyrosinreste phosphoryliert, ist die Kinase aktiv und kann selbst Signale weiterleiten. Dies konnte mit einem polyklonalen Antikörper gezeigt werden, der spezifisch nur an die phosphorylierte Form der p38-MAPK bindet.

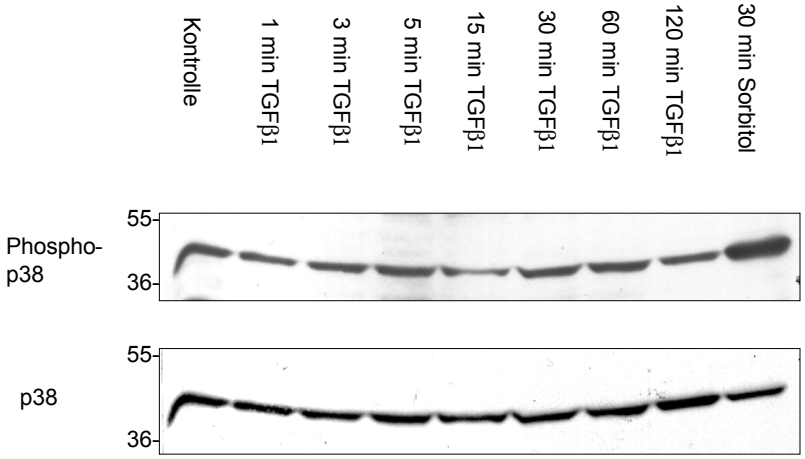

Abb. 14: Nachweis der p38-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Phosphorylierung in HEK-293-Zellen nach TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*)-Stimulation. 60 µg Protein aus RIPA (*Radioimmunoprecipitation*)-Gesamtzelllysaten wurden im zwölfprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen die phosphorylierte Form der p38 dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sieht man die Gesamtmenge an p38, angefärbt mithilfe eines monoklonalen Antikörpers.

Als Positivkontrolle wurde bei allen Versuchen .eine Stimulation mit einer 300 µM-Sorbitollösung durchgeführt. Da der osmotische Stress die p38-MAPK (Han et al., 1994) aktiviert, konnte bei den Zelllinien von einem funktionierenden p38-MAPK-Signalweg ausgegangen werden.

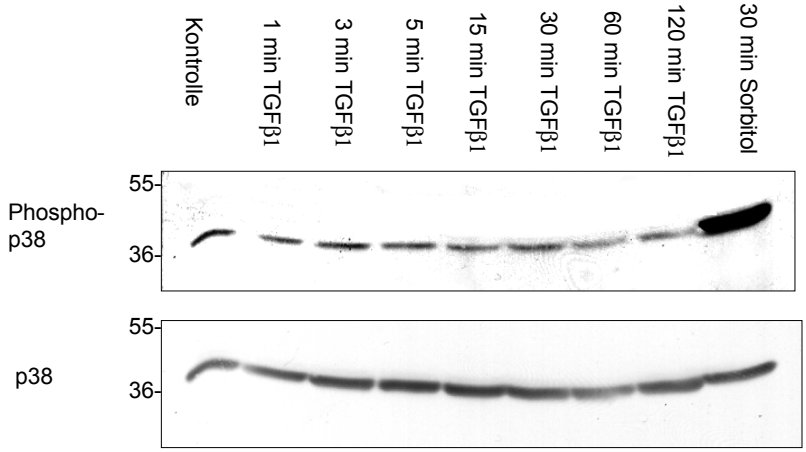

Abb. 15: Nachweis der p38-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Phosphorylierung in MCF-7-Zellen nach TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*)-Stimulation. 60 µg Protein aus RIPA (*Radioimmunoprecipitation*)-Gesamtzelllysaten wurden im zwölfprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen die phosphorylierte Form der p38 dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sieht man die Gesamtmenge an p38.

Bei den beiden Zelllinien HEK-293 (Abb. 14) und MCF-7 (Abb. 15) kam es durch die TGFβ1-Stimulation zu keiner signifikanten Veränderung des Phosphorylierungsgrades und damit zu keiner vermehrten Aktivierung der p38-MAPK.

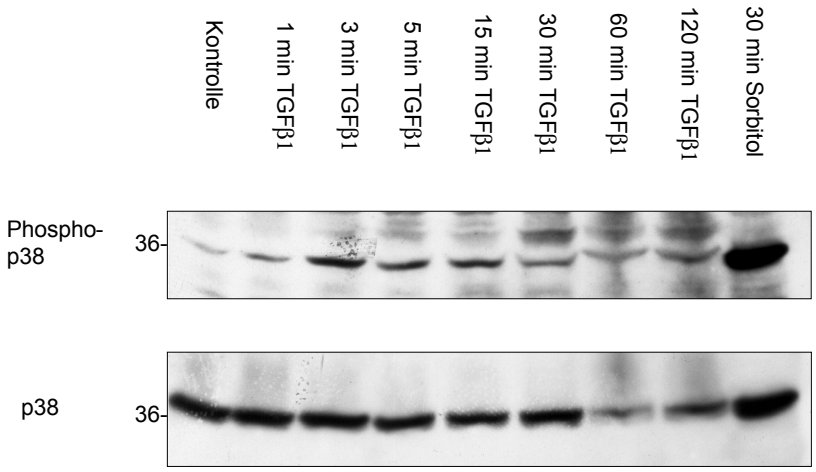

Abb. 16: Nachweis der p38-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Phosphorylierung in MDA-MB-468-Zellen nach TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*)-Stimulation. 60 µg Protein aus RIPA (*Radioimmunoprecipitation*)-Gesamtzelllysaten wurden im zwölfprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen die phosphorylierte Form der p38 dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sieht man die Gesamtmenge an p38.

Bei der Zelllinie MDA-MB-468 (Abb. 16) zeigte sich bereits innerhalb weniger Minuten nach TGFβ1-Stimulation eine deutlich Zunahme der p38-Aktivität, die auch nach zwei Stunden noch höher war als in der Kontrolle. Interessanterweise konnte ein TGFβ1-Effekt nur in einer von drei Zelllinien beobachtet werden. Gerade diese Zelllinie jedoch exprimiert das Smad4-Genprodukt nicht. Also muss die Aktivierung der p38-MAPK über einen Weg verlaufen, der das Mediatorprotein Smad4 nicht einschließt.

3.2.3 TGFβ1-induzierte ERK1/2-Aktivierung

Die beiden Signalmoleküle ERK1 und ERK2 (*extracellular signal-regulated kinases 1 und 2*) sind Teile der Ras-Raf-MEK-ERK/MAPK-Kaskade (Pages et al., 1993). Dieser Signalweg reguliert Zellfunktionen wie Wachstum oder Transkription. Die Wirkungen, die TGFβ auf ERK hat, sind sowohl als aktivierend (Ellenrieder et al., 2001), als auch als hemmend beschrieben (Giehl et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von TGFβ1 auf die Phosphorylierungsstellen von ERK1 und ERK2 im Motiv Thr-Glu-Tyr innerhalb eines Zeitraumes von zwei Stunden untersucht.

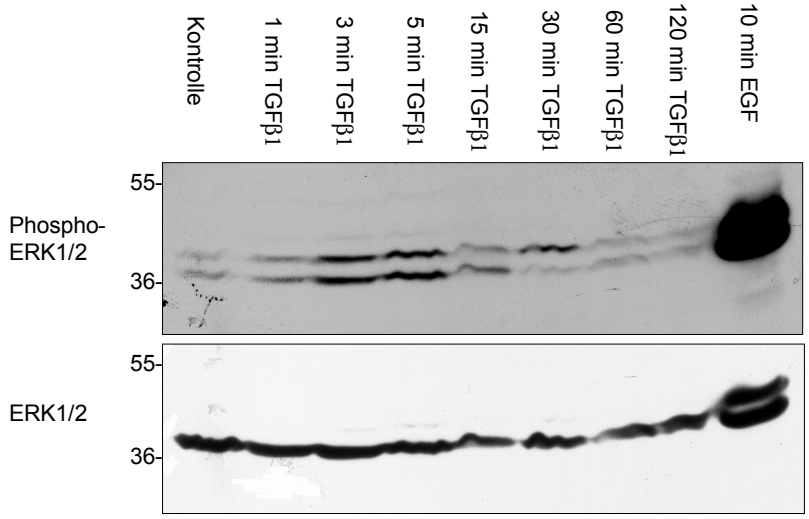

Abb. 17: ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1 und 2*)-Phosphorylierung in HEK-293-Zellen nach TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*)-Stimulation. 60 µg Protein aus RIPA (*Radioimmunoprecipitation*)-Gesamtzelllysaten wurden im zwölfprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen die phosphorylierte Form von ERK1/2 dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sieht man die Gesamtmenge an ERK1/2, angefärbt mithilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen pan-ERK.

Als Positivkontrolle wurde der starke Aktivator der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade, EGF verwendet (Cooper et al., 1984). Nach zehnminütiger EGF-Stimulation zeigte sich bei allen drei untersuchten Zelllinien eine starke ERK1/2-Aktivierung.

Bei der HEK-293-Zelllinie erkannte man, dass TGFβ1 ERK1/2 innerhalb weniger Minuten mit einem Maximum zwischen drei und fünf Minuten aktiviert und dieser Effekt nach 60 Minuten wieder verschwindet (Abb. 17).

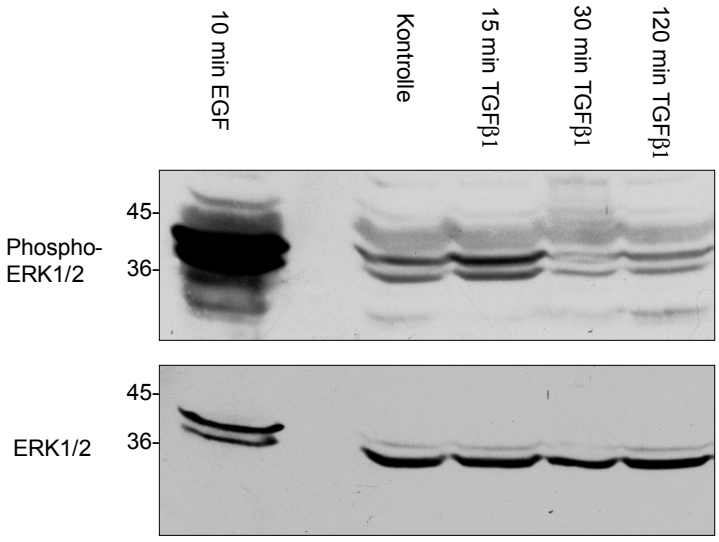

Abb. 18: ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1 und 2*)-Phosphorylierung in MCF-7-Zellen nach TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*)-Stimulation. 60 µg Protein aus RIPA (*Radioimmunoprecipitation*)-Gesamtzelllysaten wurden im zwölfprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen die phosphorylierte Form von ERK1/2 dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sieht man die Gesamtmenge an ERK1/2, angefärbt mithilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen pan-ERK.

Die Stimulation mit TGFβ1 führte bei den beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 (Abb. 18) und MDA-MB-468 (Abb. 19) zu einem Maximum der ERK-Aktivität bei 15 Minuten nach TGFβ1-Stimulation, die nach zwei Stunden auf den Kontrollwert zurückging.

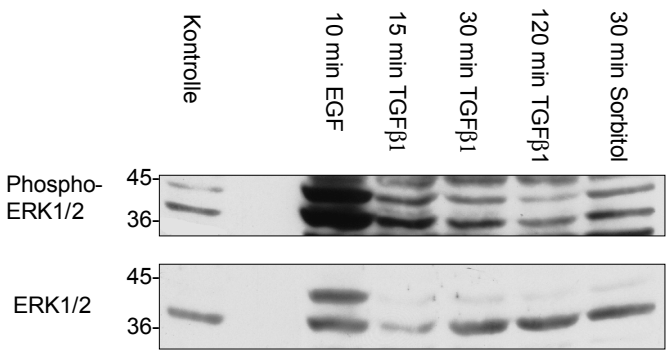

Abb. 19: ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1 und 2*)-Phosphorylierung in MDA-MB-468-Zellen nach TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*)-Stimulation. 60 µg Protein aus RIPA (*Radioimmunoprecipitation*)-Gesamtzelllysaten wurden im zwölfprozentigen SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) aufgetrennt und im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen die phosphorylierte Form von ERK1/2 dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sieht man die Gesamtmenge an ERK1/2, angefärbt mithilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen pan-ERK.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass TGFβ1 ERK1/2 sowohl in Zelllinien aktiviert, die Smad4 besitzen (HEK-293, MCF-7), als auch in solchen, die Smad4-defizient sind (MDA-MB-468). Dabei lag das Maximum der Aktivierung in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 bei 15 Minuten. Bei den HEK-293-Zellen gab es eine maximale Aktivierung innerhalb von fünf Minuten.

Dieser Signalweg scheint wie die RhoA-Aktivierung nicht auf ein funktionierendes Smad4-Genprodukt angewiesen zu sein, da die beiden Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-468 und MCF-7 fast identisch, nämlich mit einer maximalen ERK1/2-Phosphorylierung nach 15 Minuten, auf die TGFβ1-Stimulation reagierten.

3.2.4 TGFβ1-Einfluss auf das Aktinzytoskelett und Zell-Zell-Verbindungen

Das Skelett epithelialer Zellen besteht aus Filamenten unterschiedlicher Art und Größe. Darunter sind Intermediärfilamente wie etwa Tubulin und das Mikrofilament Aktin bekannt. Das Aktinskelett wiederum ist an Cadherine, die die Ca^{2+}-abhängige Zell-Zell-Adhäsion in Zonulae adhaerentes vermitteln, bzw. Integrine, welche die Verbindung zur extrazellulären Matrix an fokalen Kontakten bereitstellen, gebunden. An der Aktin-Cadherin-, respektive Aktin-Integrin-Verbindung sind einige weitere Proteine wie α-Aktinin, Plakoglobulin und Vinculin beteiligt. Da TGFβ über RhoA- und MAPK-abhängige Signalwege die epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung steuert, wurde zunächst das Aktinzytoskelett der beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 untersucht, bei denen TGFβ1 eine Aktivierung dieser Signalmoleküle bewirkt hatte.

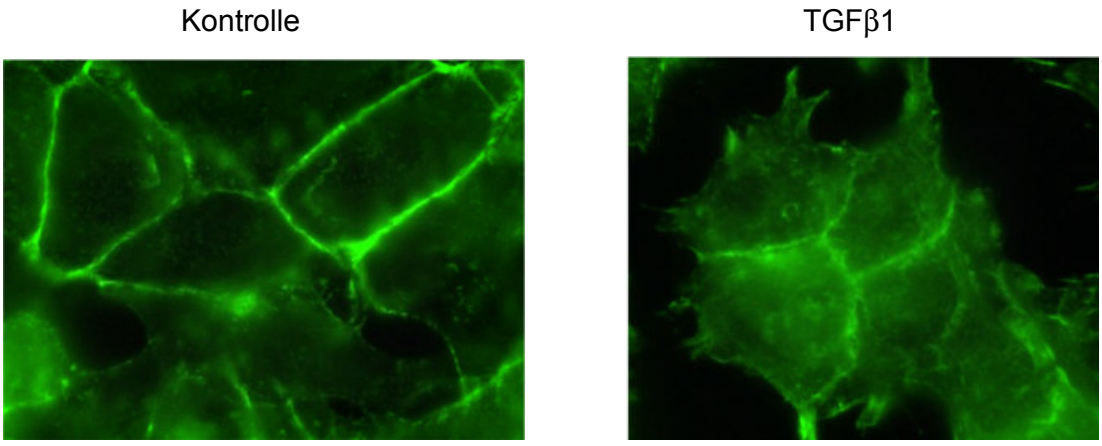

Abb. 20: Immunfluoreszenzfärbung der MCF-7-Zellen als Kontrolle (links), sowie nach Stimulation mit TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*) (rechts). Darstellung des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin-Alexa 488. Vergrößerung 126 x.

Nachdem die beiden Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 für 24 Stunden in serumfreiem Nährmedium gezogen wurden, zeigten sie einen für epitheliale Zellen typischen Phänotyp mit vor allem subkortikal gelegenem Aktin, das sich an Stellen der Zell-Zell-Adhäsion am stärksten anreicherte (Abb. 20 und 21). Die MDA-MB-468 wiesen weiterhin eine große Zahl an Stressfibers auf (Abb. 21).

Wurden die beiden Zelllinien mit TGFβ1 stimuliert, reagierten die Zellen mit einem Umbau des Aktinzytoskeletts. Dieser Effekt wurde ab einer Stimulationsdauer von 30 Minuten beobachtet und hielt noch nach 16 Stunden an. Abgebildet wurde eine Stimulationszeit von zehn Stunden. Der Umbau des Zellskeletts war bei den MDA-MB-468-Zellen sehr viel eindrücklicher als bei den MCF-7-Zellen. Die MDA-MB-468-Zellen erlangten ein spindelzelliges Aussehen und zeigten eine starke Abnahme des subkortikalen Aktins an Stellen der Zell-Zell-Verbindungen (Abb. 21). Die MCF-7-Zellen zeigten auch eine Abnahme des subkortikalen Aktins, die jedoch nicht derart ausgeprägt wie bei den MDA-MB-468-Zellen war (Abb. 20).

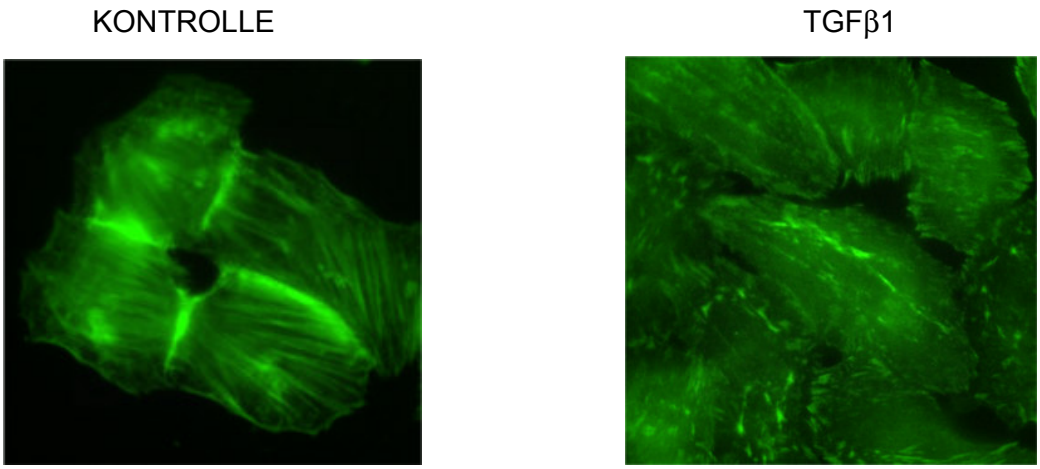

Abb. 21: Immunfluoreszenzfärbung der MDA-MB-468-Zellen als Kontrolle (links), sowie nach Stimulation mit TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*) (rechts). Darstellung des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin-Alexa 488 (grün). Vergrößerung 126 x.

Eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung von Zonulae adhaerentes und somit an der Verbindung des Aktinzytoskeletts benachbarter Zellen spielen die Cadherine. Eine Verringerung der Expression oder der Verlust von Cadherinen spielt bei der Entstehung und Progression, vor allem aber auch bei der Invasion von Tumoren eine wichtige Rolle. So haben Patienten, die an Magenkarzinomen erkranken eine bessere Prognose, wenn diese E-Cadherin exprimieren (Gabbert et al., 1996). TGFβ führt zur Dissoziation von E-Cadherin und Cateninen weg von der Zellmembran ins Zytosol (Bhowmick et al., 2001). Dieser Effekt erleichtert bei fortgeschrittenen Tumoren eine Loslösung von Einzelzellen aus dem Zellverband.

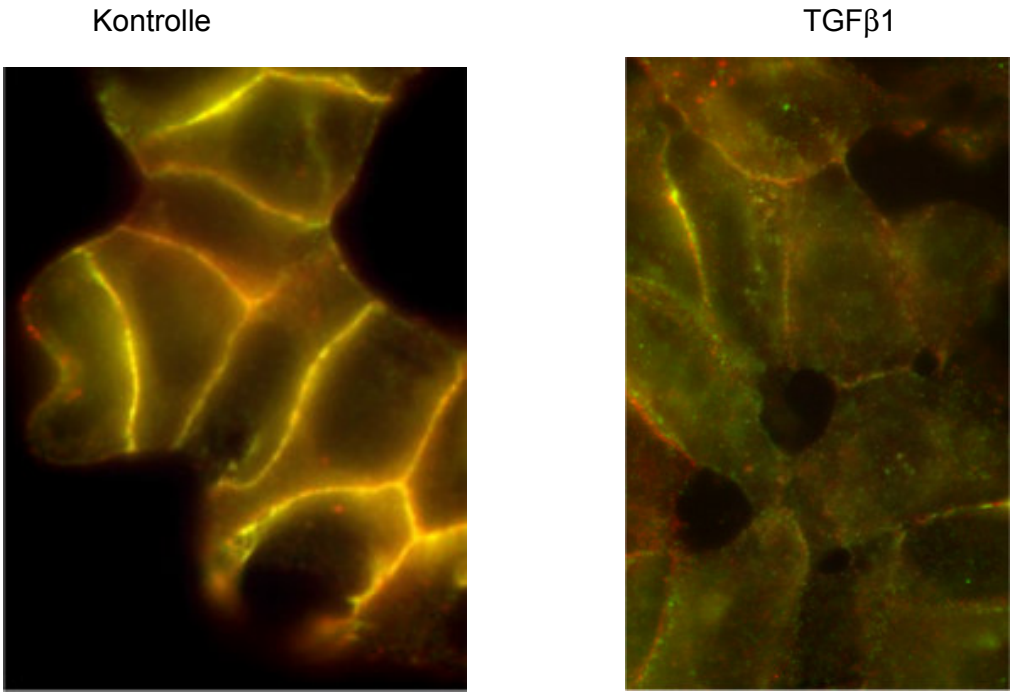

Abb. 22: Immunfluoreszenzfärbung der MCF-7-Zellen als Kontrolle (links), sowie nach Stimulation mit TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*) (rechts). Anfärbung von E-Cadherin mit einem monoklonalen Antikörper und einem Zweitantikörper markiert mit Cy3 (rot) und β-Catenin mit einem polyklonalen Antikörper und einem Zweitantikörper markiert mit Alexa-488 (grün). Vergrößerung 126 x.

Beide Zelllinien reagierten auf eine TGFβ1-Stimulation mit einer Dissoziation des E-Cadherin/Catenin-Komplexes an Stellen der Zell-Zell-Verbindungen, den Zonulae adhaerentes. Man erkennt dies an dem verringerten gelben Signal, da eine Überlagerung des roten Signals des E-Cadherins mit dem grünen Signal des β-Catenins ein gelbes Signal ergibt. Während es bei den MCF-7-Zellen sowohl zu einer Abnahme von E-Cadherin als auch von β-Catenin an Zell-Zell-Verbindungen kam (Abb. 22), stand bei den MDA-MB-468-Zellen der Abnahme von E-Cadherin ein weiterhin starkes Signal von β-Catenin entgegen (Abb. 23). Diese Beobachtung könnte sich damit erklären lassen, dass β-Catenin nicht nur mit E-Cadherin sondern auch mit anderen Cadherinen wie z.B. N-Cadherin Adhäsionskomplexe bildet und es damit weiterhin an der Zellmembran gebunden bleibt.

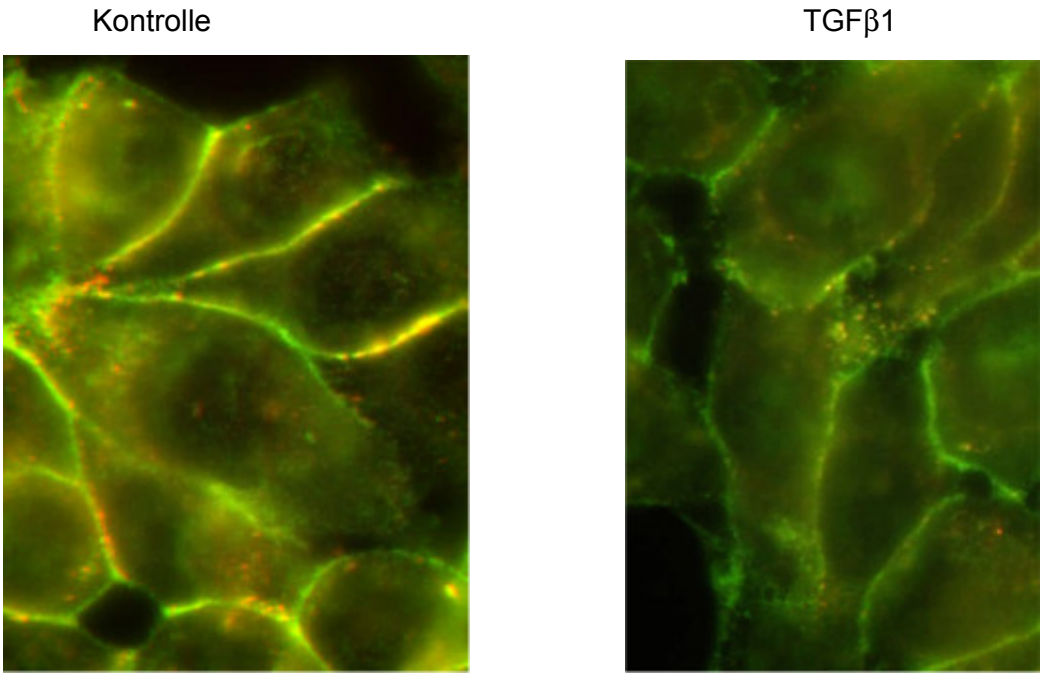

Abb. 23: Immunfluoreszenzfärbung der MDA-MB-468-Zellen als Kontrolle (links), sowie nach Stimulation mit TGFβı (*transforming growth factor beta 1*) (rechts). Anfärbung von E-Cadherin mit einem monoklonalen Antikörper und einem Zweitantikörper markiert mit Cy3 (rot) und β-Catenin mit einem polyklonalen Antikörper und einem Zweitantikörper markiert mit Alexa-488 (grün). Vergrößerung 126 x.

Anschließend an diese Untersuchungen wurde die Sublokalisation von Signalmolekülen in den Zellen bestimmt, um ein morphologisches Korrelat der proteinbiochemisch gewonnenen Daten zu erhalten, die eine Aktivierung dieser Mediatoren zeigten.

Da die MAPK ERK eine wichtige Rolle bei der Migration und Invasion von Tumorzellen spielt (Ellenrieder et al., 2001; Stähle et al., 2003) und TGFβ1 eine Zunahme der ERK1/2-Aktivität bewirkte, wurde die subzelluläre Lokalisation von phosphorylierter ERK1/2 und deren räumliche Beziehung zu Zytoskelettproteinen bestimmt.

An der Vermittlung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen sind etliche Proteine beteiligt (Abb. 5). So ist das Protein Vinculin an der Vermittlung der Verbindung des E-Cadherin/Catenin-Komplexes und der Integrine mit dem Aktinzytoskelett beteiligt. Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass die phosphorylierte, also aktive Form von ERK1/2 nicht nur im Zellkern lokalisiert ist (Chen et al., 2001), sondern auch an fokalen Kontakten zu finden ist. Sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach TGFβ1-Stimulation erkennt man bei Überlagerung der Immunfluoreszenzbilder eine Lokalisation von pERK1/2 an fokalen Kontakten. Die fokalen Kontakte sind durch die Anfärbung von Vinculin dargestellt. Nach 15-minütiger Stimulation meint man eine leichte

Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung im Zellkern und an den fokalen Kontakten zu sehen. Es scheint weiterhin zu einer quantitativen Zunahme an fokalen Kontakten nach TGFβ1-Stimulation zu kommen. Dieser Effekt war sowohl bei den MCF-7 (Abb. 24) als auch bei den MDA-MB-468 festzustellen (Abb. 25).

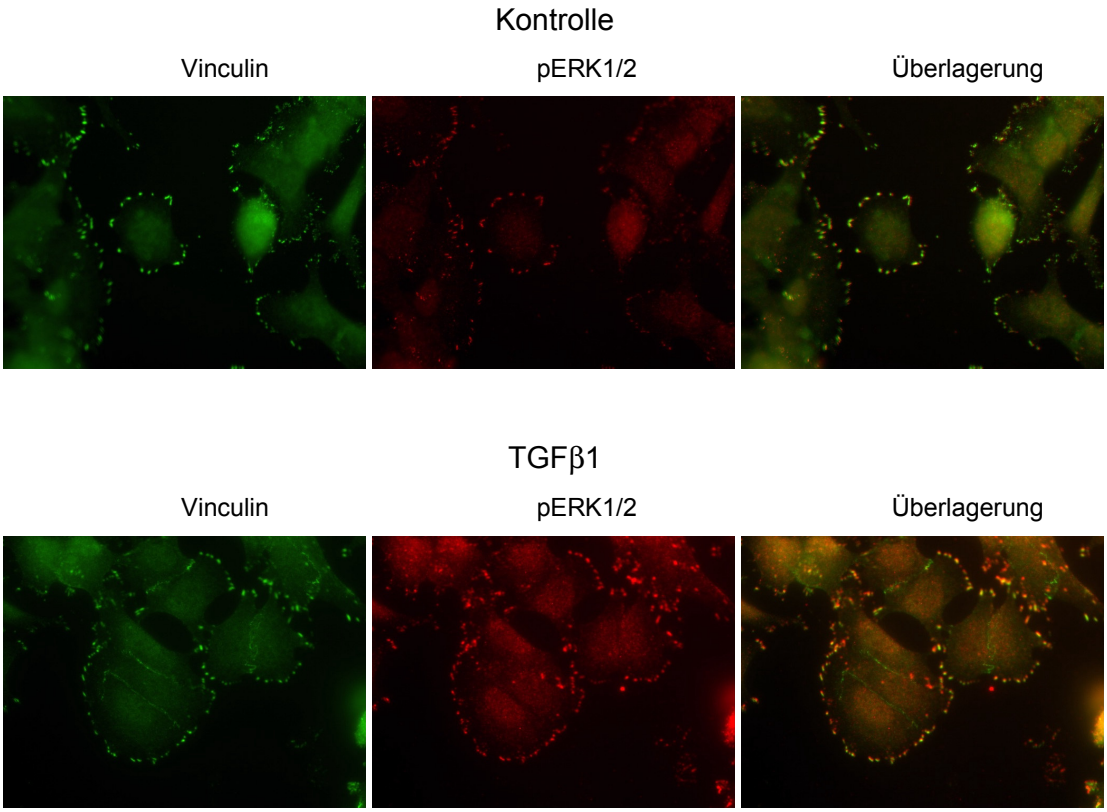

Abb. 24: Immunfluoreszenzfärbung der MCF-7-Zellen als Kontrolle (obere Reihe), sowie nach Stimulation mit TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*) für 15 Minuten (untere Reihe). Anfärbung von pERK1/2 (*phosphorylated extracellular signal-regulated kinases 1 und 2*) mit einem polyklonalen Antikörper und einem Zweitantikörper markiert mit Cy3 (rot) und Vinculin mit einem monoklonalen Antikörper und einem Zweitantikörper markiert mit Alexa 488 (grün). Vergrößerung 42 x.

Der Aufbau neuer fokaler Kontakte ist ein möglicher Teil der TGFβ1-induzierten epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung und ein Schritt auf dem Weg zur gesteigerten Migration und damit auch Metastasierung epithelialer Zellen.

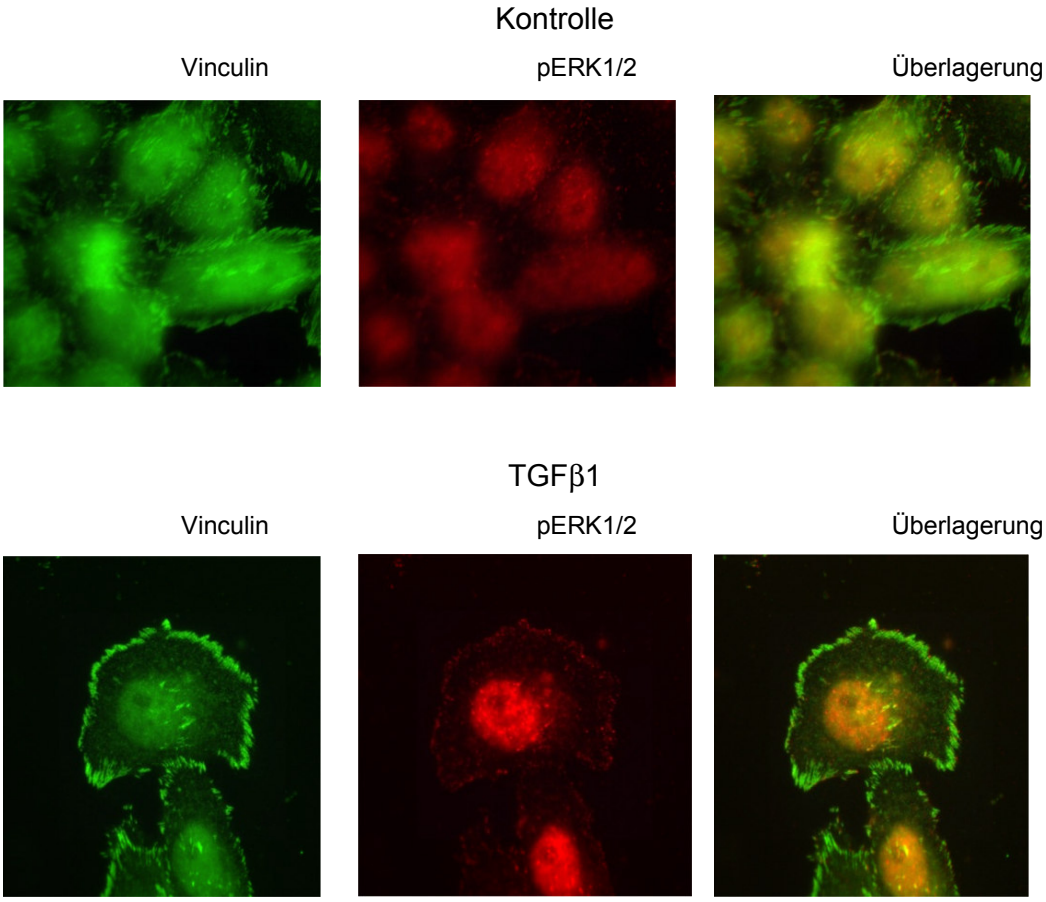

Abb. 25: Immunfluoreszenzfärbung der MDA-MB-468-Zellen als Kontrolle (obere Reihe), sowie nach Stimulation mit TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*) für 15 Minuten (untere Reihe). Anfärbung von pERK1/2 (*phosphorylated extracellular signal-regulated kinases 1 und 2*) mit einem polyklonalen Antikörper und einem Zweitantikörper markiert mit Cy3 (rot) und Vinculin mit einem monoklonalen Antikörper und einem Zweitantikörper markiert mit Alexa 488 (grün). Vergrößerung 126 x.

Es konnte also gezeigt werden, dass TGFβ1 unabhängig von der Expression von Smad4 in epithelialen Zellen zu einem Umbau des Aktinzytoskeletts führt. Es war nicht nur eine generelle Umverteilung von Aktin in der Zelle, sondern auch eine Veränderung der Lokalisation von Proteinen, die an der Zell-Zell-, bzw. Zell-Matrix-Adhäsion beteiligt sind (E-Cadherin, β-Catenin und Vinculin), zu beobachten. Weiterhin kommt die aktive Form der MAPK ERK1/2 nach TGFβ1-Stimulation verstärkt an den fokalen Kontakten vor, was deren mögliche Beteiligung bei einer epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung aufzeigt.

3.2.5 TGFβ1–Einfluss auf das Tubulinzytoskelett

Neben dem Aktinzytoskelett scheint auch das Tubulinsystem eine Rolle bei der Ausrichtung und Bewegung von Zellen zu spielen (Wittmann et Waterman-Storer, 2001). So führt eine Stimulation mit TGFβ in Zellen er zu einer Erhöhung der Polymerisation und Transkription von Zytoskelettproteinen und kann die Bildung von stabilen Mikrotubuli induzieren (Gundersen et al., 1994). Dabei handelt es sich um Mikrotubuli, die bei Zellen, die sich nicht mehr im Zellzyklus befinden, vermehrt gebildet werden und bei der Zellausrichtung und Migration vonnöten sind. Es ist weiterhin bekannt, dass Mikrotubuli Rho regulieren können. Neuere Forschungen haben jedoch auch ergeben, dass der ROCK-Effektor mDia sowohl an der Aktin-, als auch an der Tubulinpolymerisation beteiligt ist (Ishizaki et al., 2001). Daher sollte untersucht werden, ob TGFβ1 auch in den hier untersuchten Zellen zu einem Umbau des Tubulinzytoskeletts führen kann, in denen eine Aktivierung von RhoA gezeigt werden konnte.

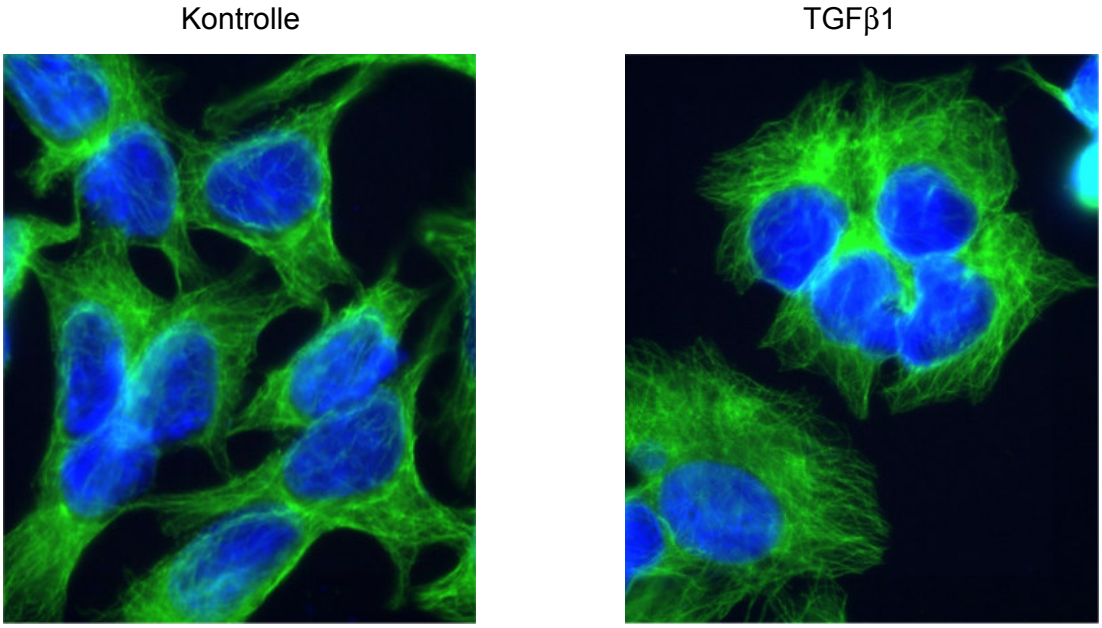

Abb. 26: Immunfluoreszenzfärbung der MCF-7-Zellen als Kontrolle (links), sowie nach Stimulation mit TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*) für zehn Stunden (rechts). Anfärbung von Tubulin mit einem monoklonalen Antikörper und einem Zweitantikörper markiert mit Alexa-488 (grün), sowie des Kernchromatins mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) (blau). Vergrößerung 126 x.

Stimuliert man die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 mit TGFβ1, deutet sich nach zehn Stunden (Abb. 26 und Abb. 27) eine leichte Veränderung des Tubulinskeletts an. Bei den MCF-7-Zellen (Abb. 26) werden an der Zellperipherie neue Tubuli aufgebaut, die sich

in Zytoplasmaausläufer erstrecken, während die unstimulierten Zellen eine homogenere Verteilung des polymerisierten Tubulins zeigen. Die MDA-MB-468-Zellen zeigen tendenziell auch einen Umbau des Tubulinskeletts, das sich in der Auflockerung des perinukleären Mikrotubuliskeletts und dem Aufbau neuer Tubuli in der Zellperipherie andeutet (Abb. 27). Für eine definitive Aussage müssten jedoch noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

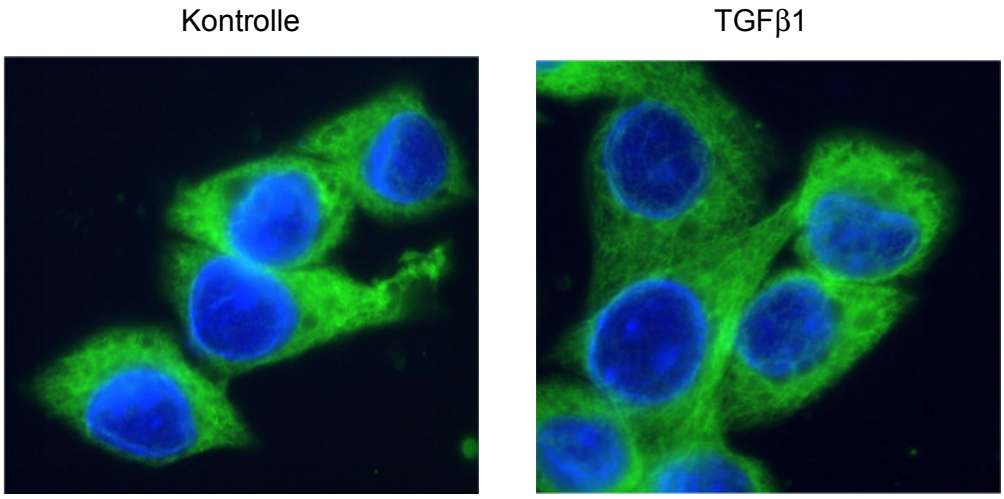

Abb. 27: Immunfluoreszenzfärbung der MDA-MB-468-Zellen als Kontrolle (links), sowie nach Stimulation mit TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*) für zehn Stunden (rechts). Anfärbung von Tubulin mit einem monoklonalen Antikörper und einem Zweitantikörper markiert mit Alexa-488 (grün), sowie des Kernchromatins mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)(blau). Vergrößerung 126 x.

Anhand dieser hier gezeigten Immunfluoreszenzuntersuchungen kann ein leichtgradiger Umbau des Tubulinzytoskeletts vermutet werden. Um definitive Aussagen treffen zu können, müssten jedoch weitere proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt werden.

4. Diskussion

4.1 Mitglieder des klassischen TGFβ-Signalweges in epithelialen Zellen

Die Mitglieder der TGFβ-Familie haben eine Vielzahl von unterschiedlichen, teils auch gegensätzlichen Einflüssen auf epitheliale Zellen. So können sie sowohl das Wachstum hemmen und Apoptose, den programmierten Zelltod, induzieren als auch bei fortgeschrittenen malignen Tumoren die Proliferation und die Metastasierung vorantreiben. Der klassische TGFβ-Signalweg verläuft über die Serin-/Threonin-Kinasen TGFβ-Rezeptor 1 und 2, die bei Aktivierung Heterotetramere bilden. Sie aktivieren daraufhin Smad-Proteine, die sich in den Zellkern bewegen und dort die Transkription von Zielgenen beeinflussen. In vielen Tumoren sind Teile dieses Signalweges defekt. Das führt dazu, dass die Zellen auf die TGFβ-vermittelte Wachstumsinhibition nicht mehr ansprechen. Inaktivierende Mutationen treten vor allem beim TGFβ-Rezeptor 1 (Wang et al., 1996) und TGFβ-Rezeptor 2 (Sun et al., 1994), sowie beim Mediatorprotein Smad4 auf. Dahingegen scheinen Mutationen bei anderen Smad-Proteinen seltener zu sein oder gar nicht aufzutreten (Riggins et al., 1999). Zu den Tumoren in denen das Smad4-Protein defekt ist, gehören die des Pankreas (Schneider et Schmid, 2003), der Brust (de Winter et al., 1997), und des Kolons (Miyaki et Kuroki, 2003). Daraus schloss man, dass dieses Genprodukt für die TGFβ-abhängige Signaltransduktion essentiell ist, da die Tumorzellen nicht mehr auf die durch TGFβ vermittelte Wachstumsinhibition und die Induktion von Apoptose ansprachen. Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass eine TGFβ-Signalweiterleitung auch unabhängig von Smad-Proteinen möglich ist (Wakefield et Roberts, 2002).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass TGFβ unabhängig von Smad4 zu einem Umbau des Aktinzytoskeletts und zur verstärkten Migration von Zellen führen kann (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002). Der genaue Mechanismus, wie der Wachstumsfaktor die Wanderung von Zellen reguliert, ist allerdings bis heute nur teilweise verstanden. Es scheinen dabei aber die beiden Familien der MAP-Kinasen und der kleinen GTPasen eine wichtige Rolle zu spielen.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden deshalb verschiedene Zelllinien auf das Vorhandensein der klassischen Mitglieder des TGFβ-Smad-Signalweges hin untersucht. In allen untersuchten Zellen konnten die beiden TGFβ-Rezeptor-Proteine 1 und 2 anhand von Immunoblots nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen stimmen für die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 mit den Ergebnissen anderer

Forscher überein (Pouliot et Labrie, 1999). Ebenso war es möglich, bei allen untersuchten Zelllinien das Smad2-Protein darzustellen, während das Smad4-Protein bei den MDA-MB-468-Zellen nicht nachzuweisen war. Diese Zelllinie besitzt an diesem Genlokus eine homozygote Deletion (de Winter et al., 1997; Pouliot et Labrie, 1999).

So wurden schließlich die beiden Smad4-kompetenten Zelllinien MCF-7 und HEK-293, sowie die Smad4-defiziente Zelllinie MDA-MB-468 ausgewählt, um den TGFβ1-Einfluss auf die Aktivität der GTPase RhoA und der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38-MAPK zu untersuchen.

4.2 TGFβ1-Einfluss auf GTPasen und ihre Bedeutung für die Organisation des Zytoskeletts

Die Familie der kleinen GTPasen spielt eine bedeutende Rolle bei der Veränderung des Skeletts und der Migration von Zellen (Raftopoulou et Hall, 2004). So führt die Aktivierung der kleinen GTPasen RhoA und Cdc42 bei der PC-3-Zelllinie, die aus einem Prostatakarzinom gewonnen wurde, innerhalb kurzer Zeit zu einem Umbau des Aktinzytoskeletts (Edlund et al., 2002). Diese Effekte werden über den RhoA-Effektor p160ROCK und den Cdc42-Effektor p38-MAPK vermittelt, da Transfektionen mit deren dominant-negativen Mutanten die TGFβ1-Effekte in den Zellen verhindern. Wurde in die Zellen eine dominant-negative Mutante des Mediators Smad4 eingebracht, zeigte sich keine Abnahme der TGFβ1-induzierten Effekte. Hierbei konnte also ein Smad4-unabhängiger TGFβ1-Signalweg charakterisiert werden, der bei dieser Zelllinie zu einer erheblichen Veränderung des Phänotyps führte (Edlund et al., 2002).

Bei den aus murinen Mammatumoren gewonnen NMuMG-Zellen konnte TGFβ1 ebenfalls eine epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung bewirken, was mit einer spindelzelligen Zellmorphologie, Verlust von Zell-Zell-Kontakten, Abbau von E-Cadherin-Komplexen und Nachweis von N-Cadherin an der Zellmembran einherging (Bhowmick et al., 2001). Dieser Effekt wurde ebenfalls über den RhoA/p160ROCK-Signalweg weitergeleitet. Es kam zu keiner signifikanten Aktivierung von Cdc42 und Rac1. Überdies konnte eine dominant-negative Mutante von RhoA die Effekte einer TGFβ1-Stimulation verhindern, wohingegen die dominant-negativen Mutanten von Rac1 und der MAP-Kinase JNK keinen Einfluss auf die EMT hatten (Bhowmick et al., 2001). Also scheint in dieser Zelllinie die Aktivierung der GTPase RhoA ein entscheidender Faktor bei der TGFβ1-induzierten EMT zu sein.

In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGFβ1 auch in mesenchymalen Zellen, nämlich in Mausfibroblasten, die GTPasen RhoA und RhoB aktivieren und eine Neuorganisation des Aktinzytoskeletts bewirken kann (Vardouli et al., 2005). Interessanterweise spielt die Smad-Bindungsstelle am TGFβ-Rezeptor 1 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Rho-GTPasen in dieser mesenchymalen Zelllinie. So ist es der TGFβR1mL45-Mutante (Yu et al., 2002), die einen Defekt in der Smad-Bindungsstelle besitzt und somit keine Smads mehr aktivieren kann, nicht mehr möglich, RhoA und RhoB anzuschalten. Es kommt daraufhin auch zu keiner Neuorganisation des Aktinzytoskeletts (Vardouli et al., 2005). Die Autoren meinen, dass dies ein Anhaltspunkt für die Beteiligung des Smad-Signalwegs bei der Rho-Aktivierung bei mesenchymalen Zellen sein könnte. Möglicherweise ist diese Bindungsstelle an der Aktivierung von GEFs beteiligt, die durch den Austausch von GDP durch GTP die GTPasen aktivieren.

Gegen eine Beteiligung der Smads2, 3 und 4 bei der schnellen Aktivierung von RhoA sprechen aber die Ergebnisse in dieser Arbeit übereinstimmend mit anderen (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002). Denn auch in der Smad4-defizienten epithelialen Zelllinie MDA-MB-468 konnte eine schnelle Aktivierung der GTPase RhoA durch TGFβ1 beobachtet werden, die im zeitlichen Verlauf von den Smad4-kompetenten Zelllinien MCF-7 und HEK-293 nicht wesentlich zu unterscheiden war. Zudem war es möglich, die Unabhängigkeit von Smad4 bei der TGFβ1-induzierten RhoA-Aktivierung ohne die Transfektion von dominant-negativen Smads zu demonstrieren, da es bei den MDA-MB-468 zu keiner Expression von Smad4 mehr kam. Dieser Zustand kommt der pathophysiologischen Signaltransduktion in Zelllinien sicherlich näher als bei Zelllinien, bei denen Gene künstlich, d.h. anhand von Transfektionen über- oder unterexprimiert werden. Denn allein der Vorgang der Transfektion von DNA in Zellen führt zu Veränderungen in der Signaltransduktion. Daneben verändert die Wirkung des Signalmoleküls selbst, das dann, wie Abb. 9 zeigt, auch in sehr großen Mengen in der Zelle vorhanden sein kann, die intrazelluläre Signaltransduktion. Gegen eine Beteiligung von Smad2 und Smad3 bei der TGFβ1-induzierten RhoA-Aktivierung spricht die Beobachtung, dass es bei den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 erst nach einer, bzw. zwei Stunden zu einer maximalen Phosphorylierung und somit Aktivierung der Smads kommt (Imamichi et al., 2005). Dennoch kann eine Beteiligung nicht definitiv ausgeschlossen werden, da bei beiden Zelllinien bereits nach 15 bis 30 Minuten eine leichte Zunahme der Smadphosphorylierung zu erkennen ist (Imamichi et al., 2005). In der murinen NMuMG-Zelllinie kam es nach Transfektion einer dominant-negativen Smad3-

Mutante weiterhin zur epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung nach TGFβ1-Stimulation, was zumindest in dieser Zelllinie eine Unabhängigkeit von Smad3 beweist (Bhowmick et al., 2001). Da aber immer Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies bestehen können, bleibt bei den untersuchten humanen Zelllinien schließlich nur der Einsatz von dominant-negativen Smads, um definitiv eine Unabhängigkeit von Smad2 und Smad3 bei der RhoA-Aktivierung zu zeigen.

In weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die RhoA-Aktivierung ein entscheidender Faktor bei der TGFβ1-induzierten Migration ist. Denn eine Hemmung des RhoA-Effektors ROCK führte zu einer Verringerung der durch TGFβ1-induzierten Migration auf basale Werte sowohl in MCF-7- als auch in MDA-MB-468-Zellen (Imamichi et al., 2005).

So kann zusammenfassend festgestellt werden, dass TGFβ1 zumindest in MDA-MB-468-Zellen RhoA unabhängig von Smad4 aktiviert. Damit stimmen die Ergebnisse mit denen zweier anderer Forschgruppen überein (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002), die auch eine Smad4-unabhängige schnelle RhoA-Aktivierung postulieren.

Neuere Daten zeigen, dass ein Mitglied der Smad-Familie, nämlich Smad7 eine Rolle bei der Aktivierung von GTPasen zu spielen scheint: Cdc42 kann in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3U nur unter Anwesenheit eines intakten Smad7-Proteins durch TGFβ1 aktiviert werden (Edlund et al., 2004) und zu einer epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung führen. Interessanterweise handelt es sich bei Smad7 um ein Mitglied der Smad-Familie, das bislang als überwiegend hemmend auf den TGFβ-Signalweg beschrieben worden ist (Moustakas et al., 2001 und Abb. 1). Ob Smad7 auch an der Aktivierung der Rho-GTPasen beteiligt ist, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch nicht untersucht.

4.3 Der Einfluss von TGFβ1 auf die Aktivierung von MAP-Kinasen und die Auswirkungen auf das Zytoskelett und die Zellmigration

Neben den kleinen GTPasen spielen auch deren Effektoren, die MAP-Kinasen mit ihren Familienmitgliedern ERK1/2, p38 und JNK eine wichtige Rolle bei der TGFβ-Signaltransduktion und der damit induzierten Veränderung des Zellskeletts und der Zellmigration. Die p38-MAPK trägt in Zellen, die aus Brustdrüsengewebe gewonnen wurden, zur epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung und zur verstärkten Migration nach TGFβ-Stimulation bei (Bakin et al., 2002). Sowohl die Hemmung der p38-MAPK

durch einen spezifischen Inhibitor (SB202190), als auch die Transfektion einer dominant-negativen MAPKK (MKK3) oder die Transfektion der dominant-negativen TGFβ-Rezeptoren 1 und 2 führt zur verringerten Transformation und Migration der Brustdrüsenzellen nach TGFβ-Stimulation (Bakin et al., 2002). So sind alle diese Signalmoleküle an der TGFβ-induzierten EMT beteiligt. In einer weiteren Mammakarzinomzelllinie, der MDA-MB-231 führte eine Blockade der p38-MAPK zur verringerten Produktion des Proteins PTHrP, das an der Metastasierung von malignen Tumoren beteiligt ist (Käkönen et al., 2002). In derselben Zelllinie konnte auch eine Beteiligung der p38-MAPK und der ERK1/2 an der Bildung der Matrixmetalloprotease-13 oder Kollagenase-3 genannt, gezeigt werden (Selvamurugan et al., 2002), welche an der Auflösung von extrazellulärer Matrix beteiligt ist und damit promigratorisch wirkt. Durch die Blockade der p38-MAPK und der ERK1/2 mit den selektiven Inhibitoren SB230580, bzw. PD98059 konnte die durch TGFβ1-induzierte Transkription der MMP-13 reduziert werden. Jedoch führte nur eine dominant-negative Mutante von Smad3 zur kompletten Hemmung der Transkription. Diese Tatsache zeigt, dass die MAP-Kinasen hier wahrscheinlich nur modulierend eingreifen, aber nicht die Haupteffektoren darstellen (Selvamurugan et al., 2002).

Weiterhin konnte durch die Hemmung der alpha-Isoform der p38-MAPK bei der MDA-MB-231-Zelllinie die Produktion der MMP-9 verringert werden. Man beobachtete konsekutiv im Vergleich weniger Knochenmetastasen, wenn die tumorbildenden Zellen in Mäuse implantiert wurden, und deren p38-MAPK durch die Transfektion einer dominant-negativen Mutante blockiert war (Suarez-Cuervo et al., 2004). Ebenso konnte TGFβ bei MCF10A-Brustdrüsenzellen eine verstärkte Aktivierung der p38 verursachen. Dies führte zu einer vermehrten Expression der beiden Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9. Zusammen mit einer durch TGFβ erhöhten Aktivität der ERK1/2 wurde weiterhin ein invasiver und migrationsfähiger Phänotyp induziert (Kim et al., 2004).

In den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien kam es jedoch im betrachteten Zeitfenster von zwei Stunden nur in einer von drei Zelllinien zu einer Aktivierung der p38-MAPK durch TGFβ1. Die beiden Zelllinien MCF-7 und HEK-293 zeigten innerhalb von zwei Stunden nach Stimulation keine signifikante Veränderung des Phosphorylierungsgrades, während MDA-MB-468-Zellen schon innerhalb weniger Minuten mit einer Zunahme der Aktivität der p38-MAPK reagierten. Eine vergleichbar schnelle Zunahme der Phosphorylierung wurde bei NMuMG-Brustdrüsenzellen beobachtet (Bakin et al., 2002). Da die MDA-MB-468-Zellen Smad4-defizient sind, zeigt dieses Ergebnis, dass die

Aktivierung unabhängig von diesem Mediatorprotein ist. Allerdings konnte durch den spezifischen Inhibitor der p38-MAPK SB203580 die durch TGFβ1 bewirkte Migration weder in MDA-MB-468- noch in MCF-7-Zellen reduziert werden (Imamichi et al., 2005). Warum es bei den beiden Zelllinien MCF-7 und HEK-293 zu keiner Reaktion der p38-MAPK auf die TGFβ1-Stimulation kam, bleibt ungeklärt. Der p38-MAPK-Signalweg scheint aber zumindest teilweise intakt zu sein, da eine Osmolaritätserhöhung des Mediums zu einer Zunahme der Phosphorylierung der p38-MAPK führte (Han et al., 1994). Am wahrscheinlichsten ist daher, dass das Ansprechen der Kinasen auf bestimmte Stimulanzien zellspezifisch ist und die beiden Zelllinien MCF-7 und HEK-293 andersartig auf die TGFβ1-Stimulation reagieren als die MDA-MB-468-Zellen.

Das zweite untersuchte Mitglied der MAP-Kinasen war die ERK1/2. In einigen Studien konnte dargestellt werden, dass TGFβ diese Kinasen sowohl in epithelialen als auch in mesenchymalen Zellen aktivieren kann. Der Signalweg der ERK1/2-Aktivierung verläuft über die Ras-, Raf-, MEK1-Kaskade (Yue et Mulder, 2000).
Auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen war in allen untersuchten Zelllinien eine Aktivierung der ERK1/2 durch TGFβ1 zu erkennen. Die Zunahme der Phosphorylierung begann bereits nach wenigen Minuten und erreichte ihr Maximum nach ungefähr 15 Minuten in den MCF-7- und MDA-MB-468-Zellen und nach fünf Minuten in den HEK-293-Zellen. Nach 120 Minuten war der Ursprungswert in allen untersuchten Zelllinien wieder erreicht. Diese Aktivierung ist zumindest bei den MDA-MB-468 unabhängig von einem funktionierenden Smad4-Mediatorprotein. Aufgrund des sehr ähnlichen Zeitverlaufs der ERK1/2-Aktvierung liegt eine Unabhängigkeit von Smad4 auch bei den MCF-7- und HEK-293-Zellen nahe. Die Beteiligung der beiden R-Smads Smad2 und Smad3 bei der ERK1/2-Aktivierung ist unwahrscheinlich, da deren maximale Aktivierung nach TGFβ1-Stimulation erst im Zeitraum zwischen einer halben Stunde bis zwei Stunden erreicht wird (Imamichi et al., 2005). Nach dieser Zeit ist die ERK1/2-Phosphorylierung bei allen drei untersuchten Zelllinien aber bereits wieder rückläufig. Die Unabhängigkeit der ERK1/2-Aktivierung vom Smad-Signalweg, könnte durch die Expression der dominant-negativen Formen von Smad2, Smad3 und Smad4 in den MCF-7- und HEK-293-Zellen, und durch die Expression der dominant-negativen Formen von Smad2 und Smad3 in den MDA-MB-468-Zellen verifiziert werden.

Eine kurzzeitige Aktivierung der ERK2 zwischen fünf Minuten und drei Stunden wurde auch schon in der Smad4-defizienten Pankreaskarzinomzelllinie IMIM-PC-2 beschrieben (Ellenrieder et al., 2001).

In zwei Mauskeratinozytenzelllinien bewirkte eine TGFβ-Stimulation mit 10 ng/ml eine kurzzeitige ERK-Aktivierung im Bereich von einer Stunde. In Kombination mit einer dominant-negativen Smad4-Mutante kam es in einer der beiden Zelllinien zu einer Erhöhung des basalen Phospho-Erk-Anteils mit konsekutiv gesteigerter Dedifferenzierung und erhöhter Migrationsrate. Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung der ERK bei der Metastasierung von Tumoren hin (Iglesias et al., 2000).

Weitere Erkenntnisse wurden mit der MDA-MB-231-Mammakarzinomzelllinie gewonnen. Wurden diese Zellen mit der TβRII-K277-R-Mutante, deren endogene Kinase nicht mehr funktionell ist, transfiziert, so konnte eine reduzierte Zellmigration beobachtet werden. Diese reduzierte Migration konnte nicht durch eine Überexpression von R-Smads, sondern nur durch die Expression des konstitutiv-aktiven TGFβ-Rezeptor 1 (ALK5TD) wieder gesteigert werden. Somit scheinen die Smads bei dieser Zelllinie keine große Bedeutung für die gerichtete Wanderung von Zellen zu haben. Wurden die PI3K, p38-MAPK, MEK- und JNK-Signalwege durch spezifische Inhibitoren gehemmt, kam es auch zu einer reduzierten Migration. Das zeigt die Bedeutung dieser Kinasen für die Migration indirekt auf (Dumont et al., 2003).

Auch in mesenchymalen Zellen ist eine rasche ERK1/2-Phosphorylierung durch TGFβ innerhalb weniger Minuten beschrieben worden. So kam es in der Leiomyom-Zelllinie LSMC zur MEK-abhängigen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun und konsekutiver Veränderung der Expression von Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Fibronektin und Kollagen (Ding et al., 2004). Die vermehrte Produktion von extrazellulärer Matrix wird häufig bei Pankreaskarzinomen beobachtet und kann durch TGFβ stimuliert werden (Menke et Adler, 2002). Außerdem kann eine vermehrte Produktion von Kollagen 1 zur Progression von malignen Tumoren des Pankreas führen (Armstrong et al., 2004).

Neben der Aktivierung der MAP-Kinasen konnte TGFβ1 auch Einfluss auf die Lokalisation von Signalmolekülen und Zytoskelettproteinen in den Zellen nehmen. Bei Untersuchungen mithilfe der Immunfluoreszenzmethode konnte eine Lokalisation der phosphorylierten Form von ERK1/2 nicht nur im Zellkern, sondern auch in fokalen Kontakten beobachtet werden. Die Rekrutierung von ERK1 in fokale Kontakte innerhalb von wenigen Minuten nach Stimulation durch TGFβ1 ist in der Pankreaskarzinomzelllinie

BxPc-3 beschrieben worden (Luettich et Schmidt, 2003). Die Translokation von ERK1/2 an neu ausgebildete fokale Kontakte ist ein entscheidender Faktor bei der Ausbreitung und Migration von Fibroblasten (Brunton et al., 2001) und Kolonkarzinomzellen (Fincham et al., 2000). Darüber hinaus ist aktiviertes ERK1/2 bei der durch den Wachstumsfaktor LPA-induzierten Migration von Pankreaskarzinomzellen beteiligt und spielt am führenden Abschnitt von migrierenden Zellen eine wichtige Rolle (Stähle et al., 2003).

Es kam nach Stimulation mit TGFβ1 weiterhin zu einer Zunahme von fokalen Kontakten. Die Tatsache, dass TGFβ1 zu einer schnellen Rekrutierung von Vinculin an die Zellperipherie und damit zum Aufbau neuer fokaler Kontakte führt, ist bereits für mesenchymale Zellen beschrieben worden. Es handelte sich dabei um Fibroblasten, die aus peritonealem Gewebe bei Laparatomien gewonnen wurden (Rout et al., 2002). Wie die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse darlegen, ist dieser Effekt auch in den epithelialen Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 zu beobachten. Die vermehrte Rekrutierung von phosphoryliertem ERK1/2 in fokale Kontakte durch TGFβ1 scheint unabhängig von Smad4 zu sein, da dies auch in der Smad4-defizienten Zelllinie MDA-MB-468 beobachtet werden konnte.

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass neben ERK auch die Signalmoleküle FAK, Src, p130cas und MLCK an der Regulation der Zellmigration beteiligt sind. Sie kontrollieren unter anderem die Zytoskelettproteine Paxillin und Vinculin, die eine wichtige Rolle beim Aufbau und Erhalt von fokalen Kontakten spielen (Webb et al., 2004). Vinculin wiederum kann ERK und damit die Migration und auch die Apoptose von Zellen regulieren (Subauste et al., 2004). Also ist es auch möglich, dass die Aktivierung von ERK1/2 und die Translokalisation in fokale Kontakte bei den beiden untersuchten Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 zur Migration beitragen könnte. In weiterführenden Arbeiten konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine Hemmung der ERK1/2 zu einer Abnahme der TGFβ1-induzierten Migration führt (Imamichi et al., 2005).

Auch das dritte Mitglied der MAPK-Familie, die JNK spielt eine bedeutende Rolle in der TGFβ1-induzierten Umwandlung des Aktinzytoskeletts und der Ausbildung von fokalen Kontakten (Imamichi et al., 2005) und kann sowohl unabhängig von Smads als auch durch diese aktiviert werden (Engel et al., 1999). Die durch TGFβ1-induzierte Migration scheint bei MDA-MB-468-Zellen unabhängig vom Smad-Signalweg zu sein, da ihnen das Smad4-Genprodukt fehlt. Eine Aktivierung der JNK spielt außerdem eine entscheidende Rolle bei der Bewegung von Zellen. So führt eine Hemmung der JNK mit dem spezifischen Inhibitor

SP600125 zu einem Rückgang der durch TGFβ1-stimulierten Migration von MCF-7- und MDA-MB-468-Zellen auf den Kontrollwert (Imamichi et al., 2005).

4.4 TGFβ1-Einflüsse auf das Aktinzytoskelett

Fortgeschrittene Tumoren sprechen oft nicht mehr auf die durch TGFβ1 vermittelte Apoptose an. Sie produzieren jedoch weiterhin TGFβ1 und stimulieren sich dadurch autokrin (Thiery, 2002). Dieser selbst produzierte Wachstumsfaktor bewirkt eine Veränderung des Phänotyps epithelialer Zellen. Sie ähneln nun mesenchymalen Zellen und besitzen damit die Möglichkeit, aus dem Zellverband auszubrechen und an andere Orte zu migrieren. Erkennbar ist dieses Phänomen durch den Abbau von Zonulae adhaerentes und Desmosomen, die die Mikro-, bzw. Intermediärfilamente benachbarter Zellen miteinander verbinden und diese dadurch im Zellverband halten. Man nennt diesen Prozess epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT). Biochemisch konnte in einigen Fällen eine verringerte Expression von E-Cadherin, ZO-1, Vinculin und Keratin und eine erhöhte Expression von Vimentin nachgewiesen werden. Dieses Phänomen wurde in den epithelialen Mauszelllinien NMuMG (Miettinen et al., 1994; Bhowmick et al., 2001), EpH4 (Oft et al., 1996) und der Zelllinie MDCK (Lehmann et al., 2000), die aus den Zellen eines Hundes abstammt, beobachtet. Auch bei Zelllinien, die aus humanem Gewebe gewonnen wurden, konnte nach TGFβ1-Stimulation eine Veränderung des Zytoskeletts festgestellt werden (Edlund et al., 2002).

In dieser Arbeit konnten in den aus humanem Gewebe abstammenden Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 nach einer Stimulation mit TGFβ1 Veränderungen des Zytoskeletts beobachtet werden. Beide Zellarten zeigten in serumfreiem Medium eine homogene, vor allem subkortikale Verteilung des Aktins. Nach Stimulation mit TGFβ1 kam es zu einer Reduktion des subkortikalen Aktins an Orten der Zell-Zell-Verbindungen. Im Vergleich zu den MCF-7-Zellen reagierte die Zelllinie MDA-MB-468 weitaus stärker mit einer Reduktion des subkortikalen Aktins. Denn die MCF-7-Zellen zeigten lediglich einen geringen Rückgang von Aktin an Orten der Zell-Zell-Verbindungen. Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise mit dem unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Ursprungszellen der MDA-MB-468- und MCF-7-Zelllinien erklären. So reagieren dedifferenzierte Mamma- und Epidermiszelllinien murinen Ursprungs auf eine TGFβ1-Stimulation mit einem invasiven Wachstum und einem Umbau des Zellskeletts, wohingegen gut differenzierte Zelllinien diese Reaktion auf TGFβ1 nicht zeigen (Cui et al., 1996; Oft et al., 1998). Da die MDA-MB-468-Zellen als weitaus dedifferenzierter

beschrieben sind als die MCF-7-Zellen, könnte dieser Unterschied die verschieden starken Umbauvorgänge am Aktinzytoskelett nach TGFβ1-Stimulation erklären.

Daran anschließend wurden die Auswirkungen einer TGFβ1-Stimulation auf den Aufbau des E-Cadherin-Zell-Zell-Adhäsionskomplexes untersucht. Dieser verbindet die Aktingerüste benachbarter Zellen über die Zellmembranen hinweg mit Hilfe von Adapterproteinen miteinander. Beide Zelllinien zeigten in serumfreiem Medium starke Zell-Zell-Verbindungen. Dargestellt wurde das durch die gemeinsame Anfärbung von E-Cadherin und β-Catenin an den Zellmembranen. Nach zehnstündiger Stimulation kam es bei beiden Zelllinien zu einer Verringerung von E-Cadherin an den Zell-Zell-Kontakten. Während bei den MCF-7-Zellen auch eine verringerte Anfärbung von β-Catenin zu beobachten war, sah man bei den MDA-MB-468-Zellen weiterhin eine starke Anfärbung von β-Catenin an Stellen der Zell-Zell-Verbindungen. Diese Dissoziation von Zell-Zell-Verbindungskomplexen war bereits bei anderen Brustdrüsenzellen, den murinen NMuMG beobachtet worden (Bhowmick et al., 2001). Ob es auch zu einer Zunahme von N-Cadherin kommt, wäre interessant zu untersuchen, da dies nach längerer TGFβ1-Stimulation sowohl in den murinen NMuMG-Zellen (Bhowmick et al., 2001) als auch in den humanen MCF10A-Zellen (Maeda et al., 2005) gezeigt werden konnte. Eine Erhöhung der Expression von N-Cadherin ist bei einigen epithelialen Zelllinien mit einer verstärkten Migration und Metastasierung verbunden (Hazan et al., 2000; Maeda et al., 2005; Nieman et al., 1999).

Bei den MDA-MB-468-Zellen wäre eine erhöhte N-Cadherin-Expression denkbar, da sie nach TGFβ1-Stimulation weiterhin viel β-Catenin an Stellen der Zell-Zell-Verbindungen besitzen und N-Cadherin mit β-Catenin ebenfalls Bindungen eingeht.

So konnte in dieser Arbeit sowohl in der Smad4-kompetenten Zelllinie MCF-7 als auch in der Smad4-defizienten Zelllinie MDA-MB-468 eine TGFβ1-induzierte Umwandlung des Mikrofilament-Zytoskeletts beschrieben werden. Es kam bei beiden Zelllinien zu einer Verringerung von Aktinmikrofilamenten an Zell-Zell-Verbindungen, was auf einen verringerten Zusammenhalt der Zellen untereinander hindeutet. Diese Destabilisierung der Zell-Zell-Verbindungen war darüber hinaus durch den Abbau des E-Cadherin-Komplexes und durch die Dissoziation von E-Cadherin von der Zellperiphärie ins Zytoplasma zu erkennen. Um die Beteiligung des Zellskelettregulators RhoA an den Veränderungen des Aktinzytoskeletts nach TGFβ1-Stimulation zu beweisen oder auszuschließen wäre der Einsatz des RhoA-Inhibitors C3 ADP-Ribosyltransferase (Aktories et al., 1992) möglich. Ebenso wäre eine Transfektion der dominant-negativen Mutante N19RhoA in die beiden

Zelllinien denkbar. Käme es nach TGFβ1-Stimulation zu einem verringerten Umbau des Zytoskeletts in den Zellen in denen RhoA gehemmt wurde, wäre dies ein Beweis für die Involvierung der GTPase RhoA in die TGFβ1-induzierte Veränderung des Zellskeletts.

4.5 TGFβ1-Einflüsse auf das Tubulinzytoskelett

Neben einer Neuorganisation von Mikrofilamenten sind auch Veränderungen des Tubulinzellskeletts, also der Intermediärfilamente durch TGFβ beschrieben worden (Gundersen et al., 1994). Sie spielen neben ihrer sehr gut charakterisierten Rolle beim Aufbau des mitotischen Spindelapparates und dem intrazellulären Stofftransport auch eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Polarität epithelialer Zellen. Seit längerem ist bekannt, dass TGFβ die Bildung von stabilen Mikrotubuli induzieren kann (Gundersen et al., 1994). Des Weiteren regulieren GTPasen (Palazzo et al., 2004) und MAP-Kinasen, wie z.B. ERK (Harrison et Turley, 2001) den Auf- und Abbau von Mikrotubuli. In H-Ras-transformierten murinen Zellen, die ein erhöhtes invasives Wachstum zeigen, wird die aktivierte ERK für den Umbau von Mikrotubuli benötigt (Harrison et Turley, 2001). Die Signalwege, die durch Regulation des Auf- und Abbaus von Mikrotubuli zur Steuerung der Migration beitragen, sind bis heute nur rudimentär identifiziert. Bekannt ist, dass sich stabile Mikrotubuli entlang der Achse migrierender Zellen ausrichten und im vorangehenden Teil der Zellen polymerisieren (Wittmann et Waterman-Storer, 2001). Diese Stabilisierung wird durch die kleine GTPase RhoA und ihren Effektor mDia reguliert. Für diesen Prozess ist weiterhin die Aktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK) vonnöten, die integrinabhängig aktiviert wird (Palazzo et al., 2004).

In den beiden untersuchten Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 zeigte sich als Reaktion auf eine TGFβ1-Stimulation nach zehn Stunden eine angedeutete verstärkte Aufspreitung der Zellperipherie mit neu gebildeten Lamellipodien und darin befindlichen Mikrotubuli. Dieser Effekt war bei den MCF-7-Zellen tendenziell stärker als bei den MDA-MB-468-Zellen. Ein Veränderung des Intermediärskeletts nach TGFβ1-Stimulation kann damit in dieser Arbeit zwar vermutet werden, es bedarf aber weiterer vor allem proteinbiochemischer Untersuchungen, um eine Veränderung des Tubulinzytoskeletts durch TGFβ1 definitiv zu zeigen.

Bis heute sind insgesamt nur wenige Erkenntnisse über die genauen Mechanismen der Einflüsse von TGFβ1 auf das Tubulinskelett gewonnen worden. Es ist allerdings beschrieben, dass der RhoA-Effektor mDia1 eine Ausrichtung von Mikrotubuli parallel

zum Aktinzytoskelett bewirkt. Diese enden in fußartigen Vorwölbungen, die wiederum reich an fokalen Kontakten sind und die Verbindung der Zelle zur extrazellulären Matrix vermitteln (Ishizaki et al., 2001).

Da bei diesen beiden Zelllinien auch eine Aktivierung der GTPase RhoA durch TGFβ1 beobachtet werden konnte, ist es gut möglich, dass RhoA zur vermuteten Tubulinregulation durch TGFβ1 beiträgt. Man könnte die Bedeutung von RhoA für die Regulation des Tubulinskeletts in den beiden Zelllinien durch den Einsatz des RhoA-Inhibitors C3 ADP-Ribosyltransferase (Aktories et al., 1992) oder durch den Einsatz der dominant-negativen Mutante N19RhoA genauer untersuchen. Würde RhoA die postulierte Bedeutung für die TGFβ1-induzierte Modulation der Mikrotubuli besitzen, würde es zu keiner oder nur verringerten Veränderung des Tubulinzellskeletts nach TGFβ1-Stimulation kommen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von TGFβ1 (*Transforming growth factor β1*) auf die Aktivität der GTPase (Guanosintriphosphat-spaltendes Enzym) RhoA (*ras homologue A*) und der MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*) ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) und p38-MAPK in Abhängigkeit der Expression von Smad4 (*Sma/mad related 4)* untersucht. Weiterhin wurden die Auswirkungen einer TGFβ1-Stimulation auf den Aufbau des Aktin- und Tubulinzytoskeletts beschrieben.

Um Unterschiede, bzw. Gemeinsamkeiten bei der TGFβ1-induzierten Aktivierung der GTPase RhoA und der MAP-Kinasen in Abhängigkeit der Smad4-Expression zu analysieren, wurden die Nierenzelllinie HEK-293 und die beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 ausgewählt. Die MDA-MB-468-Zellen zeichnen sich durch einen Verlust des Smad4-Genprodukts aus, wohingegen die beiden anderen Zelllinien Smad4 exprimieren.

Als Reaktion auf eine TGFβ1-Stimulation kam es in allen drei untersuchten Zelllinien zu einer reversiblen Aktivierung von RhoA innerhalb von 15 bis 30 Minuten. Auch die ERK1/2 wurde in allen drei Zelllinien durch TGFβ1 reversibel aktiviert. Dabei lag das Maximum der ERK1/2-Aktivierung bei den beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-468 bei 15 Minuten und bei den HEK-293-Zellen bei fünf Minuten. Eine Aktivierung der p38-MAPK konnte nur bei den MDA-MB-468-Zellen beobachtet werden. Es kam zu einer vermehrten Phosphorylierung der p38-MAPK innerhalb weniger Minuten, die nach 120 Minuten noch über dem Ausgangswert lag.

Als Reaktion auf eine TGFβ1-Stimulation konnte bei den beiden MCF-7 und MDA-MB-468 eine Umbau des Aktinzytoskeletts gezeigt werden. Die Abnahme des subkortikalen Aktins und damit der Umbau des Zytoskeletts war bei den MDA-MB-468-Zellen indes viel ausgeprägter als bei den MCF-7-Zellen. Weiterhin war bei beiden Mammakarzinomzelllinien eine Abnahme von E-Cadherin im Bereich der Zell-Zell-Kontakte zu beobachten. Des Weiteren konnten Indizien für eine Mobilisierung von durch TGFβ1-aktivierter ERK1/2 in fokalen Komplexen gefunden werden. Nach TGFβ1-Stimulation war eine Zunahme der Zahl fokaler Komplexe, dargestellt durch Vinculin, zu erkennen. Für eine Veränderung des Tubulinzytoskeletts durch TGFβ1-Stimulation konnten Hinweise gefunden werden. Um definitive Aussagen treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen folgen.

Anhand dieser Ergebnisse ist eine Expression von Smad4 für eine TGFβ1-induzierte Aktivierung der GTPase RhoA, der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38, sowie für die TGFβ1-induzierten Umbauvorgänge am Aktinzytoskelett nicht notwendig, da eine Aktivierung dieser Signalmoleküle in der Smad4-defizienten Zelllinie MDA-MB-468 gezeigt werden konnte. Auch bei den MCF-7- und HEK-293-Zellen wird eine Unabhängigkeit von Smad4 bei der Aktivierung von RhoA und ERK1/2 durch TGFβ1 belegt, da die beiden Zelllinien den nahezu gleichen zeitlichen Aktivierungsverlauf der Signalmoleküle RhoA und ERK1/2 zeigten wie die MDA-MB-468-Zellen.

Es ist damit gelungen eine Smad4-unabhängige Aktivierung der GTPase RhoA und der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 durch TGFβ1 darzustellen. Darauf aufbauend sind weitere Untersuchungen nötig, um die morphologisch erkennbaren Umbauvorgänge am Zellskelett mit den proteinbiochemischen Prozessen zu korrelieren und weiter zu erklären.

6. Literaturverzeichnis

Akhurst RJ, Derynck R: TGF-β signalling in cancer, a double-edged sword. *Trends Cell Biol.*, **11**: 44-51 (2001)

Aktories K, Mohr C, Koch G: Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **175**: 115-131 (1992)

Armstrong T, Packham G, Murphy LB, Bateman AC, Conti JA, Fine DR, Johnson CD, Benyon RC, Iredale JP: Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **10**: 7427-7437 (2004)

Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL: Phosphatidylinositol 3-Kinase function is required for Transforming Growth Factor β-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.*, **275**: 36803-36810 (2000)

Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK, Arteaga CL: p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFβ-mediated fibroblastic transdifferentation and cell migration. *J. Cell Sci.*, **115**: 3193-3206 (2002)

Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL: Transforming growth factor beta-1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell*, **12**: 27-36 (2001)

Bishop AL, Hall A: Rho GTPases and their effactor proteins. *Biochem. J.*, **348**: 241-255 (2000)

Brooks SC, Locke ER, Soule HD: Estrogen Receptor in human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J. Biol. Chem.*, **248**: 6251-6253 (1973)

Brunton VG, Fincham VJ, McLean GW, Winder SJ, Paraskeva C, Marshall JF, Frame MC: The protrusive phase and full development of integrin-dependent adhesions in colon

epithelial cells require FAK- and ERK-mediated actin spike formation: deregulation in cancer cells. *Neoplasia*, **3**: 215-226 (2001)

Cailleau R, Olive M, Cruciger QV: Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, **14**: 911-915 (1978)

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH: MAP kinases. *Chem. Rev.*, **101**: 2449-2476 (2001)

Cooper JA, Sefton BM, Hunter T: Diverse mitogenic agents induce the phosphorylation of two related 42,000-Dalton proteins on tyrosine in quiescent chick cells. *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 30-37 (1984)

Cui W, Fowlis DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, Akhurst RJ: TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell*, **86**: 531-542 (1996)

Dan I, Watanabe NM, Kusumi A: The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol.*, **11**: 220-230 (2001)

Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH: Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.*, **47**: 707-712 (1987)

Derynck R, Zhang YE: Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, **425**: 577-584 (2003)

Ding L, Xu J, Luo X, Chegini N: Gonadotropin releasing hormone and transforming growth factor beta activate mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase and differentially regulate fibronectin, type I collagen, and plasminogen activator inhibitor-1 expression in leiomyoma and myometrial smooth muscle cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**: 5549-5557 (2004)

Dumont N, Bakin AV, Arteaga CL: Autocrine transforming growth factor-β signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **278**: 3275-3285 (2003)

Edlund S, Landström M, Heldin CH, Aspenström P: Transforming Growth Factor-β-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell Biol.*, **13**: 902-914 (2002)

Edlund S, Landström M, Heldin CH, Aspenström P: Smad7 is required for TGF-β-induced activation of the small GTPase Cdc42. *J. Cell Sci.*, **117**: 1835-1846 (2004)

Edmunds JW, Mahadevan LC: MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *J. Cell Sci.*, **117**: 3715-3723 (2004)

Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gress TM: Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res.*, **61**: 4222-4228 (2001)

Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL: Interdependent SMAD and JNK signaling in Transforming Growth Factor-β-mediated transcription. *J. Biol. Chem.*, **274**: 37413-37420 (1999)

Etienne-Manneville S, Hall A: Cdc42 regulates GSK-3β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*, **421**: 753-756 (2003)

Fincham VJ, James M, Frame MC, Winder SJ: Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *EMBO J.*, **19**: 2911-2923 (2000)

Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS: Modulation of Smad2-mediated signaling by Extracellular Signal-regulated Kinase. *J. Biol. Chem.*, **277**: 41361-41368 (2002)

Gabbert HE, Mueller W, Schneiders A, Meier S, Moll R, Birchmeier W, Hommel G: Prognostic value of E-cadherin expression in 413 gastric carcinomas. *Int. J. Cancer*, **69**: 184-189 (1996)

Giehl K, Seidel B, Gierschik P, Adler G, Menke A: TGFbeta1 represses proliferation of pancreatic carcinoma cells which correlates with Smad4-independent inhibition of ERK activation. *Oncogene*, **19**: 4531-4541 (2000)

Gougos A, Letarte M: Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **265**: 8361-8364 (1990)

Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, **36**: 59-74 (1977)

Gumbiner BM: Cell adhesion: the molecular basic of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, **84**: 345-357 (1996)

Gumbiner BM: Regulation of cadherin adhesive activity. *J. Cell Biol.*, **148**: 399-404 (2000)

Gundersen GG, Kim I, Chapin CJ: Induction of stable microtubules in 3T3 fibroblasts by TGF-β and serum. *J. Cell Sci.*, **107**: 645-659 (1994)

Hall A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**: 509-14 (1998)

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ: A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, **265**: 808-811 (1994)

Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa JI, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E: Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-β-induced gene expression. *J. Biol. Chem.*, **274**: 27161-27167 (1999)

Harrison RE, Turley EA: Active ERK regulates microtubule stability in H-ras-transformed cells. *Neoplasia*, **3**: 385-394 (2001)

Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA: Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion and metastasis. *J. Cell Biol.*, **148**: 779-790 (2000)

Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M: Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*, **397**: 530-534 (1999)

Hosobuchi M, Stampfer MR: Effects of transforming growth factor beta on growth of human mammary epithelial cells in culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **25**: 705-713 (1989)

Iglesias M, Frontelo P, Gamallo C, Quintanilla M: Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent ERK signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas. *Oncogene*, **19**: 4134-4145 (2000)

Imamichi Y, Waidmann O, Hein R, Eleftheriou P, Giehl K, Menke A: TGFβ-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4. *Biol. Chem.*, **386**: 225-236 (2005)

Ishizaki Z, Morishima Y, Okamoto M, Furuyashiki T, Kato T, Narumiya S: Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat. Cell Biol.*, **3**: 8-14 (2001)

Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ: Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol*., **4**: 549-553 (1969)

Käkönen S-M, Selander KS, Chirgwin JM, Yin JJ, Burns S, Rankin WA, Grubbs BG, Dallas M, Cui Y, Guise TA: Transforming growth factor-β stimulates parathyroid hormone-related protein and osteolytic metastases via Smad and mitogen-activated protein kinases signalaing pathways. *J. Biol. Chem.*, **277**: 24571-24578 (2002)

Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW: Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma line (PC-3). *Invest. Urol.*, **17**: 16-23 (1979)

Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K: Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J. Biol. Chem.*, **147**: 1023-1038 (1999)

Kim E-S, Kim M-S, Moon A: TGF-β-induced upregulation of MMP2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signalling in MCF10A human breast epithelial cells. *Int. J. Oncol.*, **25**: 1375-1382 (2004)

Kitagawa K, Murata A, Matsuura N, Tohya K, Takaichi S, Monden M, Inoue M: Epithelial-mesenchymal transformation of a newly established cell line from ovarian adenosarcoma by transforming growth factor-beta1. *Int. J. Cancer*, **66**: 91-97 (1996)

Kolch W: Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.*, **351**: 289-305 (2000)

Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J: A mechanism of repression of TGFβ/Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.*, **13**: 804-816 (1999)

Kyriakis JM, Avruch J: Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.*, **81**: 807-869 (2001)

Lehmann K, Janda E, Pierreux CE, Rytomaa M, Schulze A, McMahon M, Hill CS, Beug H, Downward J: Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev.*, **14**: 2610-2622 (2000)

Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND: Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.*, **36**: 4562-4569 (1976)

Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G: Establishment of a continous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int. J. Cancer,* **15**: 741-747 (1975)

Lopez-Casillas F, Cheifertz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J: Structure and expression oft the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell*, **67**: 785-795 (1991)

Luettich K, Schmidt C: TGFbeta1 activates c-Jun and Erk1 via alphaVbeta6 integrin. *Mol. Cancer*, **2**: 33 (2003)

Lutz M, Knaus P: Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal.*, **14**: 977-988 (2002)

Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ: Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J. Cell Sci.*, **118**: 873-887 (2005)

Massague J: TGFβ Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**: 753-791 (1998)

Massague J, Chen YG: Controlling TGF-β signaling. *Genes Dev.*, **14**: 627-644 (2000)

Menke A, Adler G: TGFbeta-induced fibrogenesis of the pancreas. *Int. J. Gastrointest. Cancer*, **31**: 41-46 (2002)

Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R: TGF-beta induced transdifferentation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Biol. Chem.,* **127**: 2021-2036 (1994)

Mitchinson TJ, Cramer LP: Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, **84**: 371-379 (1996)

Miyaki M, Kuroki T: Role of Smad4 (DPC4) inactivation in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**: 799-804 (2003)

Moon SY, Zheng Y: Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell. Biol*., **13**: 13-22 (2003)

Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH: Smad regulation in TGF-β signal transduction. *J. Cell Sci.*, **114**: 4359-4369 (2001)

Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR: Endocytosis. *Physiol. Rev.*, **77**: 759-803 (1997)

Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ: N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J. Cell Biol.*, **147**: 631-644 (1999)

Nobes CD, Hall A: Rho, Rac, and Cdc42 GTpases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**: 53-62 (1995)

Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann e: TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev.*, **10**: 2462-2477 (1996)

Oft M, Heider KH, Beug H: TGFbeta signalling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr. Biol.*, **8**: 1243-1252 (1998)

Pages G, Lenormand P, L´Allemain G, Chmbard JC, Meloche S, Pouyssegur J: Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 8319-8323 (1993)

Palazzo AF, Eng CH, Schlaepfer DD, Marcantonio EE, Gundersen GG: Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science*, **303**: 836-839 (2004)

Panopoulou E, Gillooly DJ, Wrana JL, Zerial M, Stenmark H, Murphy C, Fotsis T: Early endosomal regulation of Smad-dependent signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **277**: 18046-18052 (2002)

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.*, **22**: 153-183 (2001)

Penheiter SG, Mitchell H, Garamszegi N, Edens M, Dore JJE, Leof EB: Internalization-dependent and –independent requirements for transforming growth factor β receptor signaling via the Smad pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **22**: 4750-4759 (2002)

Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E: Sticky business: Orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*, **112**: 535-548 (2003)

Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P: TGF-(beta) type I receptor/ALK 5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentation in NMuMG breast epithelial cells. *J. Cell Sci.*, **112**: 4557-4568 (1999)

Portella G, Cumming SA, Liddell J, Cui W, Ireland H, Akhurst RJ, Bahmain A: Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ.*, **9**: 393-404 (1998)

Pouliot F, Labrie C: Expression profile of agonistic smads in human breast cancer cells: absence of regulation by estrogens. *Int. J. Cancer*, **81**: 98-103 (1999)

Raftopoulou M, Hall A: Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.*, **265**: 23-32 (2004)

Ren XD, Schwartz MA: Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol.*, **325**: 264-272 (2000)

Ridley AJ, Hall A: The small GTP-binding protein Rho regulates the Assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**: 389-399 (1992)

Ridley AJ, Comoglio PM, Hall A: Regulation of Scatter/Hepatocyte Growth Factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol. Cell Biol.*, **15**: 1110-1122 (1995)

Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Thiagalingam S: Frequency of Smad gene mutations in human cancers. *Cancer Res.*, **57**: 2578-2580 (1999)

Rout UK, Saed GM, Diamond MP: Transforming growth factor-beta1 modulates expression of adhesion and cytoskeletal proteins in human peritoneal fibroblasts. *Fertil. Steril.*, **78**: 154-161 (2002)

Roux PP, Blenis J: ERK and p38 MAPK-activated protein-kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**: 320-344 (2004)

Santibanez JF, Iglesias M, Frontelo P, Martinez J, Quintanilla M: Involvement oft the Ras/MAPK signaling pathway in the modulation of urokinase production and cellular invasiveness by transforming growth factor-beta(1) in transformed keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**: 521-527 (2000)

Schmidt A, Hall A: Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.*, **16**: 1587-1609 (2002)

Schneider G, Schmid RM: Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol. Cancer,* **2**: 15-21 (2003)

Selvamurugan N, Fung Z, Partridge NC: Transcriptional activation of collagenase-3 by transforming growth factor-β1 via MAPK and Smad pathways in human breast cancer cells. *FEBS Lett.*, **532**: 31-35 (2002)

Stähle M, Veit C, Bachfischer U, Schierling K, Skripczynski B, Hall A, Gierschik P, Giehl K: Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK. *J. Cell Sci.*, **116**: 3835-3846 (2003)

Suarez-Cuervo C, Merrell MA, Watson L, Harris KW, Rosenthal EL, Vaananen HK, Selander KS: Breast cancer cells with inhibition of p38alpha have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice. *Clin. Exp. Metastasis*, **21**: 525-533 (2004)

Subauste MC, Pertz O, Adamson ED, Turner CE, Junger S, Hahn KM: Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J. Cell Biol.*, **165**: 371-381 (2004)

Sumi T, Matsumoto K, Nakamura T: Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **276**: 670-676 (2001)

Sun L, Wu G, Willson JKV, Zborowska E, Yang J, Rajkarunanayake I, Wang J, Gentry LE, Wang XF, Brattain MG: Expression of Transforming growth factor β type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.*, **269**: 26449-26455 (1994)

Tan MH, Nowak NJ, Loor R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C, Pickren JW, Berjian R, Douglass HO Jr, Chu TM: Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest.,* **4**: 15-23 (1986)

Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*, **2**: 442-454 (2002)

Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL: SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFβ receptor. *Cell*, **95**: 779-791 (1998)

Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C: LIM-kinase 2 and Cofilin phophorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by Transforming growth factor-β. *J. Biol. Chem.*, **280**: 11448-11457 (2005)

Wakefield LM, Roberts AB: TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12**: 22-29 (2002)

Wang J, Han W, Zborowska E, Liang J, Wang XF, Willson JKV, Sun L, Brattain MG: Reduced expression of transforming growth factor β type I receptor contributes to the malignancy of human colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **271**: 17366-17371 (1996)

Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S: Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.*, **1**: 136-143 (1999)

Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF: FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MCLK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.*, **6**: 154-161 (2004)

Weissman AM: Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**: 169-178 (2001)

de Winter JP, Roelen BA, ten Dijke P, van der Burg B, van den Eijnden-van Raaji AJ: DPC4 (SMAD4) mediates transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induced growth inhibition and transcriptional response in breast tumour cells. *Oncogene*, **14**: 1891-1899 (1997)

Wittmann T, Waterman-Storer CM: Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell Sci.*, **114**: 3795-3803 (2001)

Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J: TGFβ signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*, **71**: 1003-1014 (1992)

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J: Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, **370**: 341-347 (1994)

Wulf E, Deboben A, Bautz FA, Faulstich H, Wieland TH: Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**: 4498-4502 (1979)

Xie L, Law BK, Aakre ME, Edgerton M, Shyr Y, Bhowmick NA, Moses HL: Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line. *Breast Cancer Res.*, **5**: 187-198 (2003)

Xie W, Mertens JC, Reiss DJ, Rimm DL, Camp RL, Haffty BG, Reiss M: Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study. *Cancer Res.*, **62**: 497-505 (2002)

Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR, Guise TA: TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.*, **103**: 197-206 (1999)

Yu L, Herbert MC, Zhang YE: TGF-beta receptor activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.*, **21**: 3749-3759 (2002)

Yue J, Mulder KM: Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol. Biol.*, **142**: 125-131 (2000)

Yuniss AA, Arimura GK, Russin DJ: Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continous culture: sensitivity to asparginase. *Int. J. Cancer*, **19**: 128-135 (1977)

Zamir E, Geiger B: Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.*, **114**: 3583-3590 (2001)

Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, Piek E, Böttinger EP: Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-β. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **98**: 6686-6691 (2001)

Zheng Y: Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem. Sci.*, **26**: 724-732 (2001)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn PD Dr. Andre Menke für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die sehr guten Arbeitsbedingungen, die vielen praktischen Ratschläge und natürlich die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Guido Adler für die freundliche Aufnahme in der Abteilung.

Frau PD Dr. Klaudia Giehl und ihren Mitarbeitern für die technische und praktische Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Fischer für die Erstellung des Gutachtens.

Frau Dr. Yukiko Imamichi für die technische und moralische Unterstützung.

Den anderen Mitgliedern der Laborgemeinschaft: Simone Bräg, Claudia Müller, Claudia Längle und Marc Nguyen-tat.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt und auf meinem Weg begleitet haben.

Und schließlich bedanke ich mich bei meiner Freundin Marei, die mich wenn auch teilweise aus der Ferne begleitet hat und so einige Tipp- und Schönheitsfehler aus dieser Arbeit beseitigt hat.

Veröffentlichungen

1. Artikel

Imamichi Y, **Waidmann O**, Hein R, Eleftheriou P, Giehl K, Menke A:
TGFβ-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4.
Biol. Chem., **386**: 225-236 (2005)

2. Abstracts

Imamichi Y, **Waidmann O**, Giehl K, Menke A:
The small GTPase RhoA and ERK are mediators of Smad4-independent TGFβ signaltransduction in epithelial cells.
10.10.-13.10.2004 2nd International DFG-Symposium Cell Migration in Development and Disease, Universität Karlsruhe (TH)

Lebenslauf

Seit 01.01.2006	Ärztlicher Mitarbeiter in der Klinik für Innere Medizin 2 des Universitätsklinikums des Saarlandes bei Prof. Dr. Stefan Zeuzem
27.10.2005	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: 2,0) an der Universität Freiburg und Erlangung der Approbation als Arzt
25.10.2004- 28.08.2005	Praktisches Jahr: 1. Tertial: Innere Medizin im Evangelischen Diakoniekrankenhaus Freiburg 2. Tertial: Radiologie im Universitätsklinikum Freiburg 3. Tertial: Chirurgie im Evangelischen Diakoniekrankenhaus Freiburg
Oktober 2002- August 2004	Doktorarbeit im Labor von PD Dr. Andre Menke in der Abteilung Innere Medizin 1 des Universitätsklinikums Ulm
15.10.1999- 27.10.2005	Studium der Medizin an den Universitäten Ulm und Freiburg
01.08.1998- 31.08.1999	Zivildienst im Zytologischen Labor der Abteilung Innere Medizin 3 der Universität Ulm
01.07.1998	Allgemeine Hochschulreife am Humboldt-Gymnasium Ulm mit der Note 1,7
31.08.1985- 01.07.1998	Schulzeit
16.07.1978	Geburt in Böblingen/Baden-Württemberg