Universitätsklinikum Ulm
Institut für Pathologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Peter Möller

Die Regulation zytoskelettärer Umbauvorgänge in *KRAS*-mutierten Kolonkarzinomzellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Fenja Teresa Gläsle
geboren in Bad Saulgau

Ulm, 2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Möller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. med. Alexander Kleger

Tag der Promotion: 15.11.2018

Widmung:

Die Widmung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Steinestel K., Gläsle F., Brüderlein S., Steinestel J., Pröpper C., Möller P.:
Abelson interactor 1 (Abi1) im kolorektalen Karzinom.
Der Pathologe 2013, 34: 189–194

- Behandlung der CHD-1-Zellen mit dem Tyrosinkinaseinhibitor STI571 (Imatinib) (Abb. 12)
- siRNA-Knockdown von Abi1 in den CHD-1-Zellen (Abb. 13)

Mit schriftlicher Genehmigung vom 08.06.2017 erlaubt der Springer Verlag den oben genannten Artikel im Rahmen meiner Dissertation - vollumfänglich oder in Auszügen - abzudrucken.

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis: VI

1.) Einleitung 1

1.1) Das kolorektale Karzinom 1

1.2) Bedeutung der *KRAS*-Mutation 2

1.3) Abi1 und das Zytoskelett 7

1.4) Ziel der Arbeit 13

2) Material und Methoden 14

2.1) Verbrauchsmaterialien und Geräte 14

2.2) Methoden: 19

3.) Ergebnisse 24

3.1) Beschreibung der Zelllinien CHD-1 und HDC-9 24

3.3) Westernblot Abi1/PI3K 26

3.4) Immunfluoreszenzfärbungen Abi1/PI3K 27

3.5) Funktionelle Analysen 28

4.) Diskussion 32

4.1) Hintergrund 32

4.2) Expression von Abi1 und PI3K im kolorektalen Karzinom: 33

4.3) Lokalisation von Abi1 und PI3K: 34

4.4) Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von Abi1 35

4.5) Schlussfolgerung 39

5.) Zusammenfassung 40

6.) Literaturverzeichnis 42

Danksagung 53

Lebenslauf 54

Abkürzungsverzeichnis:

Abkürzung	Erklärung
°C:	Grad Celsius
5-FU	5- Fluorouracil
Abi1	Abelson-interacting-protein 1
Abl-HHR:	Abl-interactor homeodomain homologous region
Akt	Synonym für PKB (Proteinkinase B)
APC	Adenomatous-polyposis-coli
APS	Ammoniumpersulfat
Arp2/3	Actin-Related Proteins 2/3
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	Breakpoint Cluster Region
BRAF	Rat fibrosarcoma B Gen
c-Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
Cdc42	Cell Division Control Protein 42 Homolog
CML	Chronisch myeloische Leukämie
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ENA/VASP	Enabled Vasodilator-stimulated Phosphoprotein
Eps8	Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Substrate 8
Erk	Extracellular Signal-regulated kinases
FCS	Fetales Kälberserum
FL	Fluorouracil plus Leucovorin
FOBT	Fäkaler okkulter Bluttest
FOLFIRI	Folinsäure (Leucovorin) + Fluoruracil (5-FU) + Irinotecan

FOLFOX	Oxaliplatin + Folinsäure + Fluoruracil
GAPs	GTPase-activating Proteins
GDP	Guanosindiphosphat
GEFs	Guanine Nucleotide Exchange Factors
GTP	Guanosintriphosphat
H^2O dest.	destilliertes Wasser
H-Ras	Harvey-Ras
Hspc300	Heat Shock Protein C300
HVR	hypervariablen Region
iFOBT	Immunochemical Fecal Occult Blood Test
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IRsp 53	Insulin-Rezeptor-Substrat 53
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
l	Liter
M-2-PK	Pyruvatkinase M-2
mA	Milliampere
mDia	Diaphanous-related Formin
MEK	Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase
MMR	DNA-Mismatch-Reperaturproteine
ml	Milliliter
MOPS-Puffer	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
M-2-PK	Pyruvatkinase M2
nm	Nanometer
µm	Mikrometer
NF1	Neurofibromin 1
NOD/SCID Mäuse	Non-Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficiency
N-Ras	Neuroblastoma-Ras
N-WASP	neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome Protein

p53	Protein 53
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat) zu
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat)
Rac	Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate
Raf	Rat fibrosarcoma
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation assay
RNAi	Ribonucleic acid - Interferenz
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institut
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sos	Son of Sevenless
TBST	Tris-Buffered Saline und Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WASP	Wiskott–Aldrich Syndrome protein
WAVE	WASP-family Verprolin-homologous Protein

1.) Einleitung

1.1) Das kolorektale Karzinom

Dickdarmkrebs ist (nach Brustkrebs) die zweithäufigste Tumorerkrankung bei Frauen und (nach Prostata-und Lungenkrebs) die dritthäufigste Tumorerkrankung beim Mann. Unter den häufigsten Todesursachen in Deutschland steht das kolorektale Karzinom auf Platz zwei, direkt hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Becker et al. 2012, Tumorregister München 2016). Was sich besonders auf das Überleben auswirkt, sind Tumorstadium und Metastasierungsgrad. Während im Tumorstadium T1N0M0 (Primärtumor in der Tela submucosa, aber keine Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen) nach 5 Jahren das relative Überleben bei 98,5% liegt, geht es bei T4N0M0 schon auf 53,2% zurück. Ab M1 (Fernmetastase) sinkt es schließlich unter 10% (Tumorregister München 2016).

Diese epidemiologischen Daten erklären das hohe Forschungsinteresse am kolorektalen Karzinom und seiner Entstehung sowie im Speziellen an den Vorgängen der Metastasierung. Bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms spielen Risikofaktoren wie Ernährungsgewohnheiten, Präkanzerosen (Krebsvorstufen wie z.B. Adenome oder Colitis ulcerosa), aber auch genetische Prädispositionen eine wichtige Rolle.

Eine Vielzahl der Karzinome entsteht spontan über verschiedene Zwischenschritte, welche als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet werden (Fearon et al. 1990, Cho et al. 1992, Leslie 2002). Dieses Modell beschreibt, dass auf dem Weg vom normalen Gewebe über das Adenom (eine gutartige Gewebsmehrbildung) bis zur malignen Entartung eine sukzessive genetische Veränderung stattfindet.

Hierbei spielen Tumorsuppressorgene (z.B. das APC-Gen, Adenomatous-polyposis-coli-Gen), Protoonkogene (z.B. das *KRAS*-Gen), Transkriptionsfaktoren (z.B. p53) und andere Faktoren eine wichtige Rolle (Prives et al. 1999, Leslie 2002, Jing et al. 2012).

Einer dieser Schritte ist die mutationsbedingte, pathologische Aktivierung von KRAS (Kirsten Rat Sarcoma), einem Protein, das eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen spielt und im gesunden Zustand durch

Wachstumsfaktoren (z.B. den Epidermal Growth Factor, EGF) aktiviert wird (Bos 1989). Welche Rolle mutiertes KRAS in der Tumorgenese einnimmt werde ich später in meiner Arbeit noch genauer erläutern.

1.2) Bedeutung der *KRAS*-Mutation

KRAS ist ein Protein, das durch das *KRAS*-Gen kodiert wird, welches auf dem kurzen Arm (p) von Chromosom 12, an Position 12.1 lokalisiert ist (Ren et al. 2012). Außer KRAS existieren noch zwei weitere Proteine: HRAS (Harvey-Ras) und NRAS (Neuroblastoma-Ras). Alle drei gehören zu den sogenannten GTPasen, die an der Signalübertragung innerhalb von Zellen beteiligt sind.

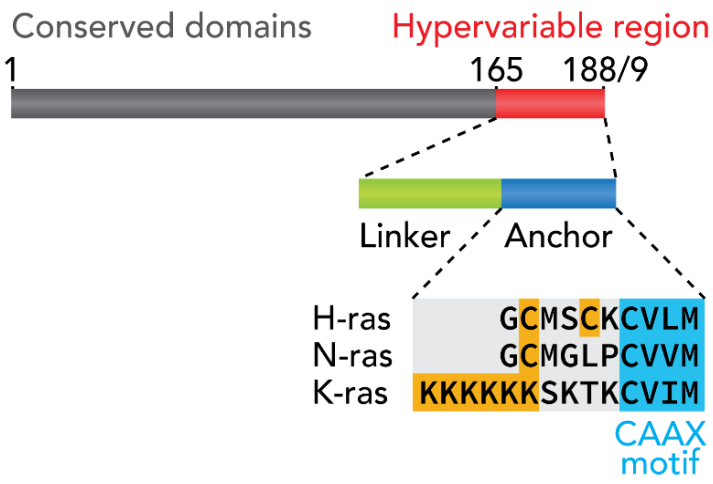

Abbildung 1: Struktur von Ras-Proteinen

Der Amino-Terminus (N-Terminus, Aminosäure 1-165, im Schaubild grau) von *HRAS*, *NRAS* und *KRAS* ist eine hoch konservierte Region des Proteins (90-100% sind identisch). Der Carboxy-Terminus (C-Terminus, Aminosäure 166-188/189, rot im Schaubild) wird auch hypervariable Region (HVR) genannt und unterscheidet sich zwischen *HRAS*, *NRAS* und *KRAS*. Die HVR enthält zum einen die Anker-Sequenz (Anchor, blau), die wiederum in ein CAAX-Motiv (eine Sequenz aus vier Aminosäuren) und eine Palmitoylierungsdomäne unterteilt wird. *NRAS* hat nur eine dieser Palmitoylierungsdomänen (C181), *HRAS* besitzt zwei (C181 und C184) und *KRAS* besitzt 6 aufeinander folgende Lysinreste (K175 - K180). Die Sequenz zwischen dem Anker und der konservierten Region ist die Link-Domäne (grün). H-ras: Harvey Rat Sarcoma, N-ras: Neuroblastom Rat Sarcoma, K-ras: Kirsten Rat Sarcoma. (Nach Hancock 2003).

NRAS ist auf Chromosom 1 lokalisiert und ist mitverantwortlich für Zellproliferation, Zellbewegung und Wachstum (Posch et al. 2013). NRAS ist in ca. 20% der malignen Melanome mutiert (Kelleher et al. 2012). HRAS ist auf Chromosom 11 lokalisiert und scheint mit verschiedenen Krebsentitäten wie dem Mamma- und Bronchialkarzinom und auch dem Harnblasenkarzinom assoziiert zu sein (Bos 1988).

Die *RAS*-Gene bilden eine Familie von Protoonkogenen (Vorläufer von Onkogenen) und kodieren für die jeweiligen Proteine (Bos 1988, Weston et al. 1997, Zhang et al. 2011, Beukers et al. 2014).

Die Mutationen im *KRAS*-Gen, die beim kolorektalen Karzinom aus dem Gen ein Onkogen machen, sind meist auf den Codons 12 (in ca. 75% der Fälle), seltener 13 oder 61 lokalisiert (Capella 1991, Fearon 2011). Die Mutation im *KRAS*-Gen ist eine sogenannte Missense-Mutation, bei der bestimmte Aminosäuren durch andere ausgetauscht werden, bei Codon 12 z.B. Glycin durch Valin oder Aspartat, bei Codon 13 meistens Glycin durch Aspartat (Ren et al. 2012). Die Mutationen von *KRAS* hat man in veränderten Krypten im Dickdarm und in hyperplastischen Polypen sowie auch Adenomen gefunden (Fearon 2011). Die Inzidenz der *KRAS*-Mutationen in kolorektalen Karzinomen liegt bei ca. 35 – 45%, wenn man die Mutationen in NRAS und HRAS dazu nimmt liegt sie sogar bei 50%. (Lièvre et al. 2006, Slattery et al. 2002).

In einer älteren Studie von 2001 zeigte sich, dass besonders eine *KRAS*-Mutation auf dem Codon 12 einen negativen Einfluss auf Pateinten mit Kolonkarzinom hatte. Das Risiko des Wiederauftretens eines Kolonkarzinoms oder des Todes war bei diesen Patienten sogar um 50% erhöht (Andreyev 2001). In einer neueren, großen Metaanalyse aus den Jahr 2012 zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen der Genmutation und der Prognose der Patienten mit einem Kolonkarzinom (Ren et al. 2012).

Aufgrund der vielen verschiedenen und sicher auch noch unbekannten Faktoren, die sich auf die Prognose beim kolorektalen Karzinom auswirken, ist es sehr schwierig den Einfluss eines einzelnen Faktors auszumachen.

Auch wenn es noch ungeklärt ist, ob die Mutation im *KRAS*-Gen einen direkten Einfluss auf die Prognose der Erkrankung hat, so hat sie doch einen auf die Wahl der Therapie (z.B. die Gabe von Cetuximab), welche definitiv einen günstigen Einfluss auf das progressionfreie und das Gesamtüberleben hat.

Patienten mit einer *KRAS*-Mutation sprechen schlechter auf die Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab (Erbitux®, Antikörper am EGF-Rezeptor, Epidermal Growth Factor-Rezeptor) an. Da durch die *KRAS*-Mutation die Tumorzelle auch ohne EGFR-Stimulation stimulationsunabhängig weiter wächst (Resat Haluk et al. 2003, Bokemeyer et al. 2011), hat eine EGFR-Blockade keine Wirkung mehr. In einer Studie aus 2011 konnte auch gezeigt werden, dass Patienten mit kolorektalem Karzinom durch die Gabe von Cetuximab und Chemotherapie mit Wildtyp-*KRAS* (nicht-mutiert) länger überlebten (22,8 Monate) im Vergleich zu den Patienten mit *KRAS*-mutierten Tumoren (13,4 Monate) (Bokemeyer et al. 2011).

Einige Studien zeigten außerdem einen Zusammenhang zwischen der Mutation und dem Auftreten von Lymphknoten-Metastasen (Oliveira et al. 2007). Besonders aggressiv schienen Tumore mit einer Mutation im Codon 12 zu sein (Mannan et al. 2012). Dies bestätigte auch eine Studie von Guerrero et al. In der Zellkultur neigten die *KRAS*-mutierten Zellen (mit der Mutation auf dem Codon 12) weniger zur Apoptose und wuchsen unkontrolliert zu großen Kolonien (Guerrero et al. 2000).

Verschiedene Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der *KRAS*-Mutation und dem gehäuften Auftreten von Fernmetastasen (Oliveira et al. 2007, Nash et al. 2010). 36 % der Patienten bei denen Metastasen innerhalb eines Jahres auftraten hatten eine *KRAS*-Mutation, 14 % der Patienten hatten keine Mutation. Außerdem gab es Hinweise auf ein schnelleres Auftreten von Lebermetastasen nach der Resektion des Primärtumors bei *KRAS*-mutierten Karzinomen (Nash et al. 2010).

Es scheint also durchaus einen Zusammenhang zwischen *KRAS*-Mutation und Metastasierungspotential zu geben.

1.2.1) Die zelluläre Funktion von KRAS:

KRAS ist ein wichtiges Protein zellulärer Signalweiterleitung von der aktivierten Zelloberfläche zum Nucleus (Fransén 2003). Die Signale führen dann zu unterschiedlichen Prozessen wie Zellwachstum, Differenzierung oder Apoptose. Aktiviert wird KRAS durch verschiedene extrazelluläre Moleküle, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone oder Neurotransmitter, die mit Rezeptoren an der Zelloberfläche interagieren, darunter sind Tyrosinkinase-

Rezeptoren, wie der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR, aber auch Nicht-Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und G-Protein gekoppelte 7-Transmembran-Rezeptoren (Abb. 2, Campbell 1998).

KRAS hat eine wichtige Bedeutung für die Tumorgenese. Das KRAS-Protein besteht aus zwei Regionen, eine hoch konservierte Region und einer hypervariablen Region (HVR), durch welche sich auch die drei RAS-Formen (KRAS, NRAS und HRAS) voneinander unterscheiden (Abb. 1, Hancock 2003).

KRAS dient dabei nun als GTPase. Eine GTPase ist ein Protein, dass GTP zu GDP hydrolysieren kann. Die geschieht durch zu Hilfenahme der GEFs (Guanine nucleotide exchange factors). GTP-KRAS besitzt eine höhere Affinität für die Interaktionspartner der einzelnen Signalkaskaden. Man kann sich dies wie einen Schalter vorstellen, wenn das RAS-Protein GTP gebunden hat ist der Schalter auf „an“ und RAS kann mit PI3K, Raf und vielen anderen Proteinen interagieren. Hat RAS GTP zu GDP hydrolysiert ist der Schalter auf „aus“. Die Hydrolyse von GTP zu GDP wird durch sogenannte GAPs (GTPase-Activating Proteins) angeregt (Abb. 2, Goldfinger 2008, Chetty et al. 2013).

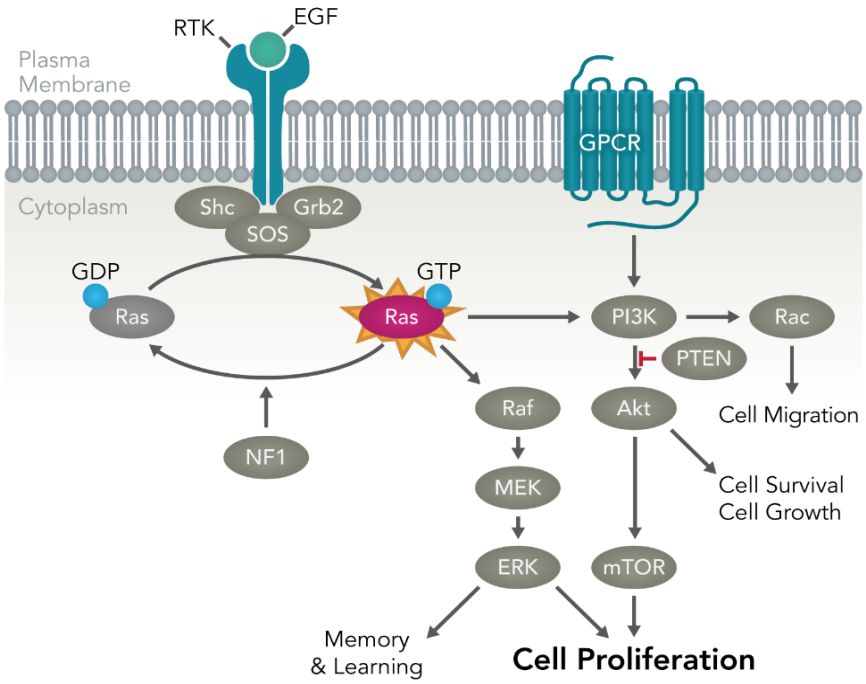

Abbildung 2: Ras-Signalweg

Angeregt z.B. durch den Wachstumsfaktor EGF, welcher am RTK (Rezeptor für Tyrosin-Kinasen) andockt, kommt es zur Aktivierung von KRAS durch Bindung von GTP. Dadurch kommt es zur Aktivierung von PI3K und der darauffolgenden Schritte, wie z.B. der Akt/mTOR-Signalweg oder der Rac-Signalweg, welcher zur Bildung von Lamellipodien führt. Ras aktiviert auch noch viele andere Signalwege, wie die Raf/MEK-Kaskade, die auch zu Zellproliferation führt. Es gibt auch Hemmsignale für die Kaskaden, wie z.B. NF1, welcher GTP wieder zu GDP dephosphoryliert und damit Ras inaktiviert, oder auch PTEN, ein Hemmer für den PI3K/Akt-Signalweg. RTK: Rezeptor Tyrosin Kinase (wie z.B. EGFR), GPCR: G-protein coupled Receptor (G-Protein gekoppelte 7-Transmembran-Rezeptoren), GDP: Guanosindiphosphat, GTP: Guanosintriphosphat, NF1: Neurofibromin 1, Raf: Rat Fibrosarcoma, MEK: Mitogen/Extracellular Signal-regulated Kinase, ERK: Extracellular-signal-regulated Kinase, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, Akt = Proteinkinase B, mTOR: Mechanistic Target of Rapamycin, Rac: Ras-related C3 botulinum Toxin Substrat, PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog, Ras: Rat Sarcoma, SOS: Son of Sevenless, Grb2: Growth Factor Receptor-bound Protein 2. (Nach Le et al. 2007).

1.3) Abi1 und das Zytoskelett

1.3.1) Das Zytoskelett:

Zellen von Eukaryoten besitzen ein Zytoskelett, welches für die mechanische Stabilisierung der Zelle und ihre äußere Form, für aktive Bewegungen der Zelle, sowie für Bewegungen und Transporte (auch Signalübertragungen) innerhalb der Zelle gebraucht wird (Freeman et al. 2014). Man kann es sich als filigranes, makromolekulares Netzwerk vorstellen. Man unterscheidet drei Klassen von Zytoskelettfilamenten, mit jeweils unterschiedlichem Aufbau und Aufgaben: Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli (Pritchard et al. 2014).

Intermediärfilamente sind ca. 10 nm dick und sind an der Migration von Zellen beteiligt (Leduc et al. 2015). Außerdem sind sie wichtig für die Weiterleitung von Signalen innerhalb der Zelle (Leube et al. 2015).

Die zweite Gruppe beinhaltet die Mikrotubuli. Sie sind aus Dimeren aufgebaut und bilden eine Art Rohrsystem. Sie sind wichtig für Zellteilung und den Vesikel-Transport innerhalb der Zelle (Etienne-Mannevile 2013).

Aktinfilamente sind 5-7 nm dick und übernehmen unter anderem Aufgaben bei der Endo-und Exozytose, der Zelladhäsion und bei der Bewegung der Zelle, durch Ausbildung von Lamellipodien (Schnittler et al. 2014).

Ich möchte mich in dieser Arbeit auf die Zellmigration durch Ausbildung von Lamellipodien durch die Aktinfilamente konzentrieren.

Damit sich eine Zelle überhaupt bewegen kann, muss zuvor in der Zelle ein Umbau des Zytoskeletts stattfinden. Dabei wird ein breitbasiges Lamellipodium ausgebildet, bestehend aus einem verzweigten Aktinskelett (Abb. 3). Verantwortlich für den Umbau des Zytoskeletts sind zahlreiche intrazelluläre Signalwege, beginnend bei KRAS, über PI3K, Rac und schließlich dem Komplex aus WAVE1 (Proteine aus der Wiskott-Aldrich-Syndrom-Familie) und Abi1 (Innocenti et al. 2003), welches die Bildung von Verzweigungen am Aktinskelett durch die Aktinnukleationsfaktoren Arp 2/3 (Actin-Related Proteins) anregt. Dies ist ebenfalls ein Proteinkomplex, bestehend aus 7 Untereinheiten. Es bildet sich dabei an einem bereits bestehenden Aktinfilament ein Seitenzweig (Abb.3, Le Clainche et al. 2008).

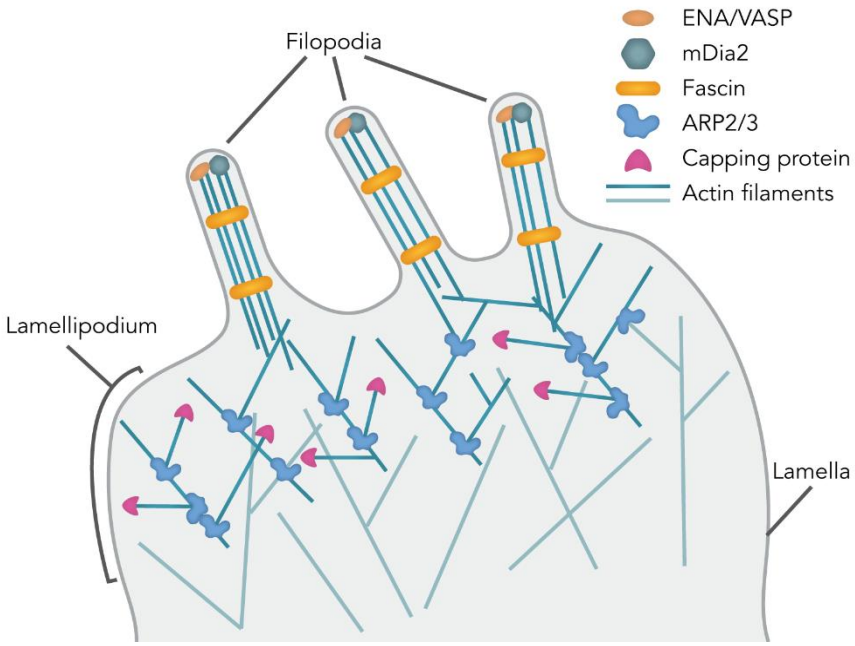

Abbildung 3: Lamellipodium und Filopodien

Man sieht den Unterschied zwischen dem breiten Lamellipodium und den schmalen Filopodien, beide bestehen jedoch aus Aktinfilamenten, die im Lamellipodium, gebildet am Apr2/3-Komplex, verzweigte Strukturen annehmen. Es wird vermutet, dass die Filopodien sensorische Fähigkeit besitzen und für die Richtung der Bewegung verantwortlich sind. Die Capping-Proteine stoppen die Bildung weiterer Seitenzweige. mDia2 wird durch den WASP/WAVE-Komplex angeregt und ist für die Ausbildung von Filopodien durch unverzweigte Aktinfilamente mitverantwortlich.

Arp2/3: Actin-Related Proteins, mDia: Diaphanous-related formin, ENA/VASP: Vasodilator-stimulated phosphoprotein. (Nach Heasman et al. 2008).

Wie genau die einzelnen Komplexe und Untereinheiten miteinander interagieren, ist noch nicht vollständig verstanden. Außerdem hat jedes Protein sehr viele Interaktionspartner, was die Analyse einzelner Faktoren erschwert. Bekannt ist, dass die oben genannten Proteine an der Bildung von Lamellipodien beteiligt sind und dabei miteinander interagieren. Insbesondere für Abi1 konnte gezeigt werden, dass es eine wichtige Rolle bei der Bildung von Lamellipodien spielt (Innocenti et al. 2004).

1.3.2) Filopodien

Die Bildung von Filopodien wird durch Cdc 42 und dann einen Komplex aus WASP/IRsp53/mDia angeregt (Lim et al. 2008, Chauhan 2009).

Filopodien sind nadelförmige Auswüchse am Rand der Zelle. Sie scheinen jedoch eher der Orientierung als der eigentlichen Bewegung der Zelle zu dienen. Auch sie bestehen im Inneren aus Aktinfilamenten, sind ca.100–200 nm dick und ca. 10 µm lang (Mellor 2010). Zellen, bei denen die Bildung von Filopodien unterdrückt wurde, bewegten sich ohne klare Orientierung (Bornschlögl 2013).

1.3.3) Aufbau von Abi1:

Abi1 (Abelson-interacting-protein 1) ist ein 65 kDa-Protein, welches an der Umgestaltung des Zytoskeletts zur Bildung von Zellausläufern (Lamellipodien) beteiligt ist (Steffen et al. 2004, Leng et al. 2005).

Um mit seinen Interaktionspartnern zu interagieren, besitzt das Protein verschiedene Interaktionsdomänen, u.a. eine Q-SNARE-Einheit für WAVE, eine Abl-interactor Homeodomain Homologous Region, um mit dem Abelson-interactor Protein und PI3K zu interagieren, und eine Serin-reiche Region als Bindungsstelle für Eps8 und auch PI3K (Schmidt et al. 2009, Kotula 2012).

Abi1 wurde zuerst in Zusammenhang mit der Abelson-Tyrosinkinase beschrieben, für welches sie ein Substrat darstellt. Entdeckt wurde es in einer Leukämie-Zelllinie von Mäusen in den 90er Jahren (Shi et al. 1995).

In einer Arbeit von 2012 konnte eine Abi1-Mutation und die Rolle von Abi1 als Onkogen bei verschiedenen Krebsentitäten, u.a. Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Prostatakarzinom und Leukämie gezeigt werden (Hossain et al. 2012). Auch für das kolorektale Karzinom hat sich gezeigt, dass Abi1 an der Tumorgenese beteiligt ist (Steinestel et al. 2012, Steinestel et al. 2014).

1.3.4) Zusammenhang zwischen KRAS und Abi1

In einer Arbeit von K. Steinestel konnte gezeigt werden, dass Abi1 in *KRAS*-mutierten Kolonkarzinomzellen deutlich überexprimiert war, verglichen mit gesundem oder entzündetem Gewebe. Dies lässt darauf schließen, dass Abi1 von KRAS beeinflusst wird und dabei diesem womöglich nachgeschaltet ist. (Abb.5, Steinestel et al. 2012). In dieser Arbeit wurden die Kolonkarzinomzellen von zwei Zelllinien verwendet: CHD-1 und HCD-9. Diese verwende ich in meiner Arbeit ebenfalls. Steinestel et al. charakterisierte diese Zelllinien immunzytologisch und molekularbiologisch und zeigte hierbei bei der CHD-1-Zelllinie eine aktivierende Mutation im Codon 13 des *KRAS*-Onkogens (Austausch der Aminosäure Glutamin

mit Arginin). Die HDC-9-Zelllinie besitzt keine *KRAS*-Mutation. Bei beiden Zelllinien liegt ein Wildtyp für das *BRAF*-Codon vor. (Steinestel et al. 2012).

Ein Zwischenschritt zwischen KRAS und Abi1 ist die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). PI3K wird u.a. durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (z.B. EGF), aber auch direkt durch die RAS-GTPasen aktiviert (Rodriguez-Viciana et al. 1994). PI3K aktiviert dann durch Phosphorylierung von PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat) zu PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5) -Trisphosphat) verschiedene Signalwege, u.a. über Rac und Abi1 zur Bildung von Lamellipodien, aber auch über Cdc 42 zur Bildung von Filopodien. Über Akt und mTor (Mechanistic Target of Rapamycin) kommt es zu antiapoptotischen Prozessen und Zellwachstum (Courtney et al. 2010).
Es gibt Hinweise darauf, dass PI3K in der Signalkaskade zwischen KRAS und Abi1 liegt (Courtney et al. 2010). Hierbei interagiert die regulatorische Untereinheit p85 von PI3K mit Abi1, es bildet sich anschließend ein Komplex aus Abi1-p85-Eps8 und Sos-1, um dann die weiteren Schritte (u.a. Akt) in den Signalkaskaden zu aktivieren und die Umgestaltung des Aktinzytoskeletts einzuleiten (Vivanco 2002, Innocenti et al. 2003, Wang et al. 2007). Unterstützt wird diese These noch von Steinestel et al. durch die Applikation des PI3K-Inhibitors Wortmannin ($C_{20}H_{24}O_8$; 50nM, 72h) zu den beiden Kolonkarzinom-Zelllinien (CHD-1 und HDC-9), dabei kam es zu einer vollständigen Unterdrückung der Abi1-Expression sowie der Akt-Phosphorylierung. In dieser Arbeit wurden auch Western Blots mit Antikörpern gegen Abi1 und PI3K durchgeführt, um die Expressionslevel von Abi1 und PI3K-p85 in den KRK-Zelllinien zu bestimmen. Es konnte gezeigt werden, dass Abi1 in den CHD-1-Zellen stärker exprimiert wird als in den HDC-9-Zellen.
(Steinestel et al. 2012, Abb. 4)
Die Arbeitsgruppe von Wang fand jedoch auch Hinweise darauf, dass es noch einen zweiten Signalweg zu geben scheint und zwar von KRAS direkt zu Abi1 (Wang et al. 2007).

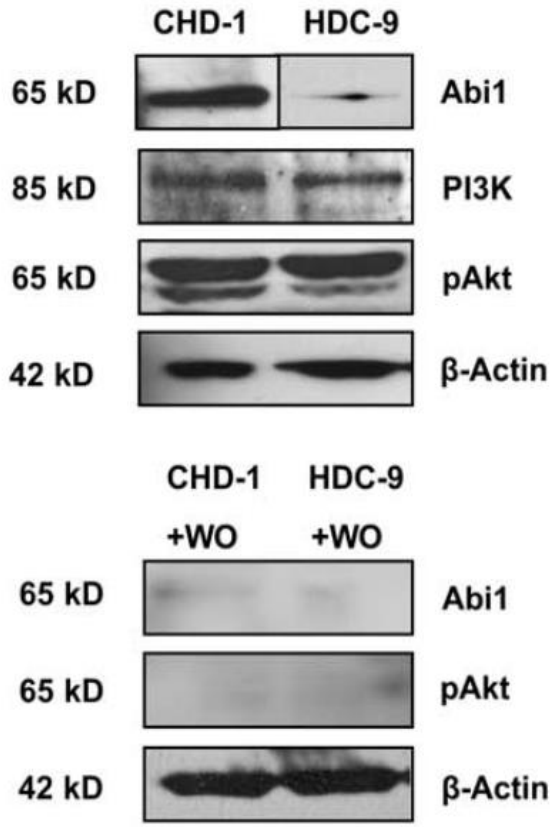

Abbildung 4: Western Blot

A: Höhere Expression von Abi1 und leicht stärkere Akt-Phosphorylierung in den CHD-1-Zellen im Vergleich zu den HDC-9-Zellen. B: Applikation von 50nM Wortmannin (WO, ein PI3K-Inhibitor) unterdrückt vollständig die Expression von Abi1 sowie die Phosphorylierung von Akt. Abi1: Abelson-interactor Protein 1, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, pAkt: Proteinkinase B, +WO: Zugabe von Wortmannin. (Mit Genehmigung aus Steinestel et al. 2012).

Ein weiterer Interaktionspartner von Abi1 ist die Tyrosinkinase c-Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1). Sie kommt sowohl an der Zellmembran, im Zytosol aber auch im Kern vor. C-Abl kann z.B. von EGF aktiviert werden (Woodring et al. 2003) und führt dann zu einer Signalkaskade (über GTPasen, aber auch Sos), die dann zur Transkription und zur Bildung von Lamellipodien führen können (Sirvent et al. 2008). Auch Proteine mit einer SH3-Domäne, z.B. Abi1, können c-Abl aktivieren (Woodring et al. 2003).

Zur Inhibierung der Abelson-Tyrosinkinase wurde bereits ein Hemmstoff entwickelt. STI571 oder Imatinib (unter dem Handelsnamen Glivec®) wird in der

Therapie der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt. (Chalandon et al. 2012, Shah et al. 2014). Bei der CML kommt es durch eine balancierte Chromosomentranslokation zu einer unkontrollierten Zellvermehrung. (De Klein et al. 1986, Radich 2012). Der Inhibitor blockiert die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase c-Abl und stoppt so das unkontrollierte Wachstum (Mauro et al. 2002, Gambacorti-Passerini et al. 2003).

Da die Rolle der Abelson-Tyrosinkinase bei der Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms noch nicht gut untersucht ist, wird Imatinib momentan klinisch hierfür noch nicht eingesetzt; um Abi1 in vitro bei Experimenten zu hemmen lässt es sich jedoch gut einsetzen.

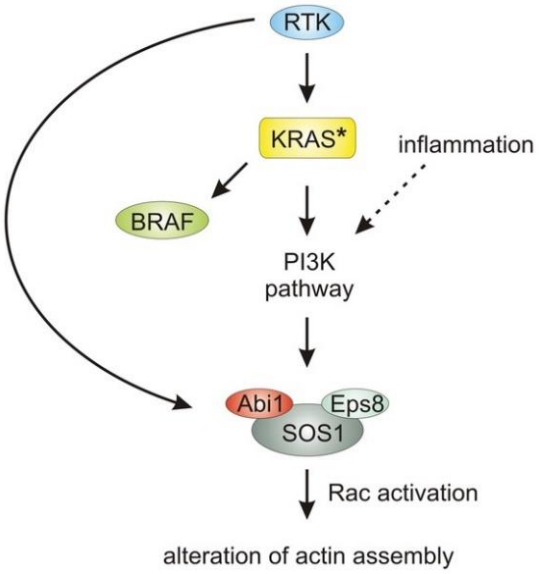

Abbildung 5:

Einfluss auf das Aktinzytoskelett durch KRAS, PI3K und Abi1.

Wenn ein Ligand an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) bindet, kommt es zur Aktivierung von KRAS (im mutierten Zustand ist es dauernd aktiviert).

KRAS aktiviert unter anderem dann einerseits den BRAF (B1 Rapidly accelerated fibrosarcoma) -Weg und andererseits den PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase) -Weg. Der letztere führt zur Aktivierung des Abi1/Sos1/Eps8-Komplexes. Über die GTPase Rac kommt es dann zur Bildung der verzweigten Aktinfilamente durch WAVE und Apr2/3 (nicht im Bild).

RTK: receptor tyrosine kinase; K-Ras: Kirsten rat sarcoma; BRAF: B1 Rapidly accelerated fibrosarcoma; PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase; Abi1: Abelson interactor 1; Eps8: Epidermal growth factor receptor kinase substrate; Sos1: Son of sevenless homolog 1; Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate. WAVE: WASP-Family Verprolin-homologous Protein, Arp 2/3: Actin-Related Proteins 2/3. (Mit Genehmigung aus Steinestel et al. 2012).

1.4) Ziel der Arbeit

Ziel meiner Arbeit ist es zu zeigen, dass die Abi1/PI3K-Interaktion in *KRAS*-mutierten Zellen zu einer veränderten Zellmorphologie führt. Dies könnte durch eine erhöhte KRAS-abhängige Abi1-Expression bedingt sein, was mittels Westernblot untersucht werden soll.
Man kann vermuten, dass in den mutierten Zellen eine bessere Fähigkeit zur Bildung von Lamellipodien besteht und die Zellen sich somit besser bewegen können.

2) Material und Methoden

2.1) Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.2) Verbrauchsmaterialien:

Reagenzien	Hersteller	Ort
Acrylamid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
APS	Dako	Hamburg, Deutschland
Blotpapiere	VWR	Darmstadt, Deutschland
Bradfort-Lösung	Sigma Aldrich	Saint-Louis, USA
DAPI	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Elektrophorese-Gele	Life Tech. Corporation	Carlsbad, USA
Eukobrom	Tetenal + Co AG	Norderstedt, Deutschland
Entwickler-Lösungen (1 Teil Eukobrom, 5 Teile Wasser)		
FCS	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Fixierer	Tetenal + Co AG	Norderstedt, Deutschland
H2O	Merck	Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
IMDM Medium	Lonza	Verviers Belgien
Isopropanol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
KCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Minocylcin	Sigma Aldrich	Saint Louis, USA
MOPS-Puffer	Merck	Darmstadt, Deutschland
Na2HPO4-2H2O	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
Nitrocellulosemembran	Whatman	Freiburg, Deutschland
Permanent AP Red Chromogen	Zytomed	Berlin,
DeutschlandPeroxidase	Zytomed	Berlin, Deutschland
RIPA	Roche	Mannheim, Deutschland
RPMI-Medium	Lonza	Verviers, Belgien
SDS	Roth	Karlsruhe, Deutschland

STI571	Bio Vision	Milpitas, USA
TEMED	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Texas-Red-gekoppeltes Phalloidin	ThermoFisher	Eugene, Oregon, USA
Tiamulin fumarate	Sigma Aldrich	Riedel-de Haën, Seelze Deutschland
Transfektionsreagenz	Optifect, Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Tris	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Triton X-100	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA	Lonza	Verviers, Belgien
Tween 20	Merck	Darmstadt, Deutschland
Wortmannin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland

Puffer:

Puffer:	Reagenzien:
10x PBS	80 g NaCl 2g KCl 2g KH2PO4 11,5g Na2HPO4*2H2O pH: 7,4
PBS	1 Teil 10x PBS 9 Teile H2O
10x Transfer-Puffer	58 g Tris 29g Glycin 18,5ml 20% SDS 1L H2O
Transfer-Puffer	100 ml 10x Transferpuffer 100ml Methanol 1L H2O
DAPI-Lösung	70µl DAPI-Stocklösung 70µl 2x SSC
20x SSC	175,3g NaCl 88,2g tri-Natriumcitrat-Dihydrat HCl 25% bis pH von 7,0 1l H2O
10 x TBS	106g NaCl

	48,8g Tris HCl 25% bis pH von 7,4 2l H2O
TBS-T	0,5ml Tween 20 100ml 10x TBS 1l H2O pH 7,4
NuPAGE 20x MOPS SDS Running Puffer	104,6g MOPS 60,6g Tris 10g SDS 3g EDTA 500ml H2O
WASH A	150ml Formamid 30ml 20x SSC 300ml H2O
WASH B	2,5ml 20xSSC 500ml H2O

Gele:

Trenngel:

- 10ml H^2O dest.
- 12ml Acrylamide
- 7,5ml Tris Buffer low
- 300µl 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, Natrium-dodecylsulfat)
- 150µl 10% APS (Ammoniumpersulfat)
- 15µl TEMED (Tetramethylethylendiamin)
- Isopropanol

Sammelgel:

- 9,15ml H^2O dest.
- 2ml Acrylamide
- 3,25ml Tris Buffer upper
- 15 µl 10% SDS
- 75µl 10% APS
- 15µl TEMED

Zelllinien:

Zelllinie	Herkunft
CHD-1-Zellen,	Pathologie Ulm, Deutschland
HDC-9-Zellen	Pathologie Ulm, Deutschland

(Koretz et al. 1994, Möller et al. 1994)

Antikörper:

Antikörper	Hersteller	Ort
Beta-Actin-Antikörper	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Anti-Abi1-Antikörper	BIOZOL Diag. Vertrieb	Eching, Deutschland
Anti-PI3K-Antikörper	Antibodies-online GmbH	Aachen, Deutschland
pAkt-Antikörper	Cell Signaling Technology	Leiden, Niederlande
Anti-Mouse-Antikörper	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
Anti-Rabbit-Antikörper	Santa Cruz	Dallas, USA
Ki-67 (Clone 30-9)	Ventana Medical Systems	Tucson, USA
CDX-2 (Clone EPR2764Y)	Ventana Medical Systems	Tuscon, USA
Cytokeratin 20 (Clone SP33)	Ventana Medical Systems	Tuscon, USA
Cytokeratin 7 (Clone SP52)	Ventana Medical Systems	Tuscon, USA
Y435 Phospho-Abi1	Abcam	Cambridge, USA
Cortactin	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA

2.1.3) Geräte:

Geräte	Hersteller	Ort
Brutschrank	Heraeus	Osterode, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe	Thermo Scientific	Waltham, USA
Entwickler	AGFA	Bonn, Deutschland
Filterpapier	VWR	Radnor, USA
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Kulturfalschen Nunc EasyFlask	ThermoScientific	Waltham, USA

Laminar-Flow Werkbank	BDK	
Mikrozentrifuge	Neolab	Heidelberg, Deutschland
Nitrocellulose Membran	Whatman	Freiburg, Deutschland
pH-Meter	WtW	Weilheim, Deutschland
Photometer Ultrospec 2100pro	GE Healthcare	Freiburg, Deutschland
Photomikroskop	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Röntgenfilm	FujiFilm	Düsseldorf, Deutschland
Schüttler	Köttermann	Edison, USA
Serologische Pipetten (2-25ml)	NuncGmbH	Wiesbaden, Deutschland
Standardreaktionsgefäß	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Vortex	Scientific Industries	Bohemia, USA
Waage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Well Nunc-Platten	ThermoScientific	Waltham, USA
Zentrifuge	Heraeus	Osterode, Deutschland
Zentrifuge kühlend	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zytospin Zentrifuge Cytospin3	ThermoScientific	Waltham, USA

Aktenzeichen des Ethikvotums der Universität Ulm: 162/13

2.2) Methoden:

2.2.1 Zellkultur:

Um die von uns angenommene Abhängigkeit der Proteine Abi1 und auch PI3K von KRAS und dessen Mutation zu untersuchen, begannen wir mit der Anlegung von Zellkulturen.

Die beiden verwendeten Zelllinien waren Kolonkarzinom-Zellen. Die Zellen der ersten Zelllinie (CHD-1-Zellen) besaßen eine Mutation im K-Ras-Gen auf Codon 13 (Aspartat statt Glycin). Die zweite Zelllinie (HDC-9-Zellen) besaß keine Mutation.

Die beiden Zelllinien wurden bereits durch Arbeitsgruppen in den 1990er Jahren etabliert (Möller et al., 1994, Koretz et al. 1994).

Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen angesetzt. Als Medium wurde 8-10ml IMDM/RPMI (Verhältnis 4:1) und 10% FCS verwendet.

Im Fall eines Mycoplasmennachweises erfolgte die Behandlung der Zellen mit Antibiotika (Minocyclin und Tiamulin).

Die Zellkulturflaschen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5%CO^2 gelagert. Ein Mediumwechsel erfolgte 2-3-mal pro Woche. Zur Herstellung der Subkulturen wurde Trypsin/EDTA zum Ablösen der adhärenten Zellen von den Zellkulturflaschen verwendet.

Um den Effekt der im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren auf die Zellen zu untersuchen, wurden parallel CHD-1- und HDC-9-Zellen in Medium mit lediglich 2% FCS kultiviert. Diese Zellen wurden dann mit den in 10% Serum kultivierten Zellen im Westernblot verglichen.

2.2.2 Herstellung von Zellpellets:

Die Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA von den Kulturflaschen gelöst, mit Medium versetzt und in ein Reagenzglas gegeben, anschließend für 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit 2ml PBS resuspendiert und nochmals mit 1000 Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde wieder abgesaugt und das Pellet erneut mit 0,5ml PBS resuspendiert, die Lösung dann in ein Mikroreaktionsgefäß (1,5ml Fassungsvermögen) gegeben und nochmal für 3 Minuten bei 800 Umdrehungen

zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und das Pellet zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

2.2.3 Behandlung der Zellen mit Wortmannin:

Wortmannin wird aus verschiedenen Schimmelpilzen gewonnen und dient als PI3K-Inhibitor (Michio et al. 1995).

Die Idee bestand daraus den Zellen in der Kultur Wortmannin zu zusetzen, um die PI3-Kinase zu hemmen. Mit diesen Zellen wurden dann Abi1-Expressionsanalysen durchgeführt, um eine mögliche Abhängigkeit der Abi1-Expression von der PI3K-Aktivität zu überprüfen.

2.2.4 Scratch-Assay:

Zur Darstellung der Zellmigration diente uns der Scratch-Assay. Zuerst wurden die CHD-1- und die HDC-9- Zellen von den Zellkulturflaschen abgelöst und anschließend mit 3ml Medium versetzt. Diese Lösung wurde auf 6 Wells gleichmäßig verteilt (drei Wells für CHD-1 mit je 1ml der Zell-Medium-Lösung und drei Wells für HDC-9, mit je 1ml der Zell-Medium-Lösung). Anschließend wurde mit einer sterilen Pipette der Scratch in der Mitte jedes Wells gesetzt. Daraufhin wurden die Zellen fotografiert und dann wieder bei 37°C und 5% CO^2 in den Brutschrank verbracht. Nach 2 und 5 Tagen wurden die Zellen wieder fotografiert, um so die Zellmigration darzustellen.

2.2.5 Immunhistochemie und Immunfluoreszenzfärbung

Um die Lokalisation und ggf. auch eine Kolokalisation von Abi1 und PI3K in den Zellen zu zeigen entschieden wir uns zur Immunhistochemie und Immunfluoreszenz. Um den Zellkern darzustellen färbten wir nicht nur die beiden Antikörper, sondern auch die DNS mittels DAPI.

Für die Immunhistochemie/Fluoreszenz stellten wir zuerst Zytospins der Zellen her:

Dafür wurden einige wenige Zellen von der Kulturflasche abgelöst und mit 1ml Medium in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde mit 800 Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das zurückgebliebene Pellet mit Trypsin resuspendiert, mit Medium aufgefüllt und nochmals mit 800 Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde

wieder verworfen und das Pellet mit PBS resuspendiert. Danach wurde gewartet bis sich das Pellet wieder absetzt, um dann vom Überstand 80µl zu entnehmen und diesen nochmal für 3 Minuten bei 800 Umdrehungen zu zentrifugieren. Daraufhin wurde der Überstand und die Deckgläser in der Klammer in die Zytospin-Zentrifuge eingestellt. Nach dem Beladen der Deckgläser mit den vereinzelten Zellen ließen wir die Deckgläser trocknen. Zum Schluss wurden sie dann noch für ca. 10 Minuten in Aceton eingestellt. Zur Aufbewahrung kamen die Proben dann bei -20°C in den Kühlschrank.

Für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz konnten wir nun die Objektträger der Zytospins verwenden.

Die Objektträger wurden zuerst zweimal mit PBS und danach einmal mit PBS + 0,2% Triton gewaschen. Anschließend wurde für 30 Minuten mit 5% FCS in PBS geblockt. Der Abi1-Antikörper (Verdünnung 1:250 im Blocker, 100µl pro Kammer) und der PI3K-Antikörper (Verdünnung 1:100 im Blocker, 100µl pro Kammer) wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Objektträgern belassen. Danach wurde mit PBS gewaschen und der zweite Antikörper (anti-Mouse [roten Fluoreszenzfarbstoff] für Abi1 und anti-Rabbit gekoppelt an einen günen Fluoreszenzfarbstoff] für PI3K) für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgebracht. Daraufhin wurde erneut mit PBS gewaschen und anschließend DAPI (1:50.000 in PBS, blaue Färbung) für 3 Minuten aufgebracht. Zum Schluss wurde noch dreimal mit PBS gewaschen und die Fixierlösung aufgebracht.

Anschließend konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Wir fertigten außerdem eine Merge-Aufnahme der beiden Antikörper an, um die oben genannte Kolokalisation zu zeigen.

Für die Immunhistochemie verwendeten wir ebenfalls den Abi1-Antikörper (Verdünnung 1:200) und brachten diesen für 60min bei Raumtemperatur auf. Danach wurde ein Wasch-Puffer aufgebracht und die Proben dann mit Peroxidase für 5 min geblockt, anschließend wurden sie nochmals für 2 min mit Wasch-Puffer abgewaschen. Es wurde dann AP-Polymer für 30 min bei Raumtemperatur aufgebracht und dann erneut gewaschen, um die ungebundenen Antikörperreste zu entfernen. Es wurde dann Permanent AP Red Chromogen aufgebracht, um die Antikörperbindungsstellen sichtbar zu machen. Es wurden noch weitere Antikörper (jeweils in der durch den Hersteller angegebenen Verdünnung) verwendet, um Ki-67, CDX-2, Cytokeratin 20 und Cytokeratin 7 anzufärben. Zum Schluss wurden die

Proben erneut mit destilliertem Wasser gewaschen und dann mit Hämatoxylin gegengefärbt und getrocknet.

2.2.6. Behandlung mit STI571

Die CHD-1-Zellen wurden für 24h mit 10 µM STI571 behandelt und mit Texas-Red-gekoppeltem Phalloidin gegengefärbt; anschließend wurden die Zellfortsätze hinsichtlich Anzahl und Morphologie immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht.
Die statistische Auswertung (Vergleich der Zellfortsätze nach Behandlung mit STI571 im Vergleich zur Vektorkontrolle) erfolgte mit dem Students t-test (SigmaPlot 12.0, Systat Software, Erkrath, DE). Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.2.7 Abi-1-Knockdown

Für den Knockdown wurden die CHD-1-Zellen mit einem Abi1-RNAi-Konstrukt liposomal transfiziert und ebenfalls mit Texas-Red-gekoppeltem Phalloidin gegengefärbt; anschließend wurden die Zellfortsätze wieder immunfluoreszenz-mikroskopisch ausgewertet. Zur Quantifizierung der Lamellipodien sowie der Anzahl der Filopodien wurde die Methode von Mejillano et al. angewandt (Mejillano et al. 2004).
Die verwendeten RNAi-Konstrukte waren vorab bereits verifiziert und publiziert (Proepper et al. 2007). Ein tatsächlicher Abi1-Knockdown in CHD-1- Zellen wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blotting durch unsere Arbeitsgruppe erneut bestätigt (Steinestel et al. 2014). Die statistische Auswertung (Vergleich Lamellipodien/Filopodien nach RNAi-Transfektion im Vergleich zur Vektorkontrolle) erfolgte mit dem Students t-test.

2.2.8 Westernblot:

Um die unterschiedliche Expression der Proteine Abi1 und PI3K inCHD-1 und HDC-9 nachzuweisen, fertigen wir Westernblots an.
Proteinlysate: Die Zellpellets wurden mit 1ml PBS gewaschen, in der Kältezentrifuge bei 5000 Umdrehung für 5 Minuten zentrifugiert, danach wurde der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden 30-60µl RIPA zum Pellet gegeben, das Ganze gut gemischt und für 10 bis 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach wurde das Pellet mit RIPA wieder gut gemischt und nochmal in der

Kältezentrifuge für 1 -2 Minuten bei 14.000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand ergab dann die Probe mit den Proteinen zur Weiterverarbeitung.

Nun wurden die Proteinkonzentrationen der Proben (von CHD-1 und HDC-9) mittels Photometer gemessen und anschließend mittels Zugabe von entsprechendem Volumen an RIPA und je 15 µl NuPage® auf die gleiche Konzentration gebracht. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben auf 70°C für 10 Minuten erhitzt.

Zum Auftrennen der Proteine nach Ladung und Teilchengröße führten wir eine Gelelektrophorese durch. Als Puffer verwendeten wir 200ml MOPS-Puffer (20-fach konzentriert) in einer einfachen Konzentration (190ml H^2O dest. + 10ml MOPS-Puffer). Die Gele wurden mit 10µl Größenstandard und je 10µl der Protein-Lysate befüllt.

Wir benutzten sowohl Gele von Life Technology Corporation, als auch selbst hergestellte Gele (siehe oben). Die Laufzeit betrug für die selbstgegossenen Gele 2 Stunden bei 120 V, für die Gele von Life Technology Corporation 1 Stunde bei 150 V.

Zum Blotten verwendeten wir Transferpuffer, 4 Blotpapiere und eine Nitrozellulosemembran. Die Laufzeit betrug ca. 1 Stunde bei 60mA und 8-12 V.

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran für 20 bis 30 Minuten bei 37 °C in einer Magermilch-Lösung (5g Milchpulver in 100ml TBST) inkubiert und anschließend mit TBST gewaschen.

Zur Herstellung der Antikörperlösungen verdünnten wir den Abi1-Antikörper 1:1000 mit TBST, den anti-mouse-Antikörper 1:1000 mit TBST, den PI3K-Antikörper 1:500 mit TBST, den anti-Rabbit-Antikörper mit 1:10000 mit TBST und den Beta-Actin-Antikörper 1:5000 mit TBST. Die primären Antikörper wurden dann bei 4°C über Nacht auf die Membran inkubiert. Die sekundären Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Dazwischen wurde die Membran jeweils für 3 bis 5 Minuten mit TBST gewaschen.

Im Anschluss Entwickeln auf Film. Hierzu wurde zuerst die Membran mit Substrat A und B im Verhältnis 1:1 beschichtet, anschließend Entwicklung in der Dunkelkammer mittels Entwickler (Eukobrom 1:5) und Fixierer (1:10). Die Belichtungszeit betrug jeweils zwischen 20 Sekunden und 2 Minuten.

3.) Ergebnisse

3.1) Beschreibung der Zelllinien CHD-1 und HDC-9

Zur funktionellen Charakterisierung von Abi1 im kolorektalen Karzinom (KRK) wurden zwei KRK-Zelllinien verwendet, die in den 1990er Jahren von Silke Brüderlein initial etabliert und publiziert wurden (Koretz et al. 1994, Möller et al. 1994). Die Zelllinien sind **CHD-1** und **HDC-9**. Die CHD-1-Zellen besitzen eine KRAS-Mutation auf dem Codon 13, die HDC-9-Zellinie hingegen nicht. Bei beiden Zellinien liegt ein Wildtyp für das BRAF-Codon vor (Steinestel et al. 2012).

Die Morphologie der beiden Zelllinien in der Zellkultur unterscheidet sich deutlich voneinander. Während CHD-1 insgesamt größere Zellen besitzt und diese eher unregelmäßig geformt sind, sind die HDC-9-Zellen kleiner und rundlicher und bilden in der Zellkultur eher filopodienartige Ausläufer. Im Gegensatz hierzu neigen die CHD-1-Zellen eher zu Lamellipodienbildung.

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen die zelluläre Morphologie beider Zelllinien im Vergleich.

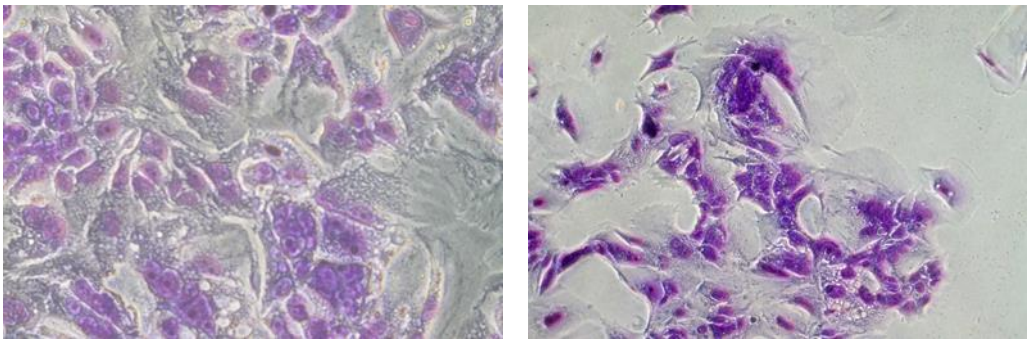

Abbildung 6: Morphologie der CHD-1-Zelllinie in der Zellkultur

Die Zellen sind groß und besitzen breitbasige Zytoplasmaausläufer.

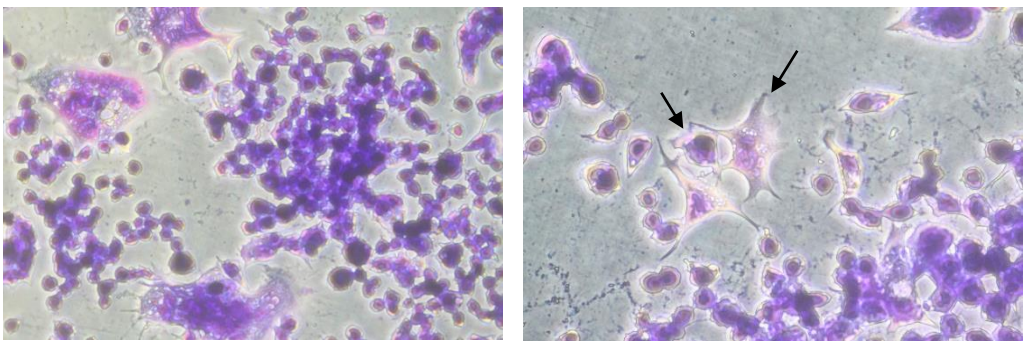

Abbildung 7: Morphologie der HDC-9-Zelllinie in der Zellkultur

Die Zellen sind kleiner und besitzen schmale, filopodienartige Zytoplasmaausläufer.

Das Migrationsverhalten der beiden Zelllinien untersuchte ich mittels eines Scratch Assays. Mit einer sterilen Pipette wurde in einen geschlossenen Zellrasen eine artifizielle Lücke gesetzt und das Schließen dieser Lücke bei Tag 0, Tag 2 und Tag 5 unter dem Mikroskop fotodokumentiert (Abb. 8). Man erkennt hier erneut die deutlich unterschiedliche Morphologie der Zellen.

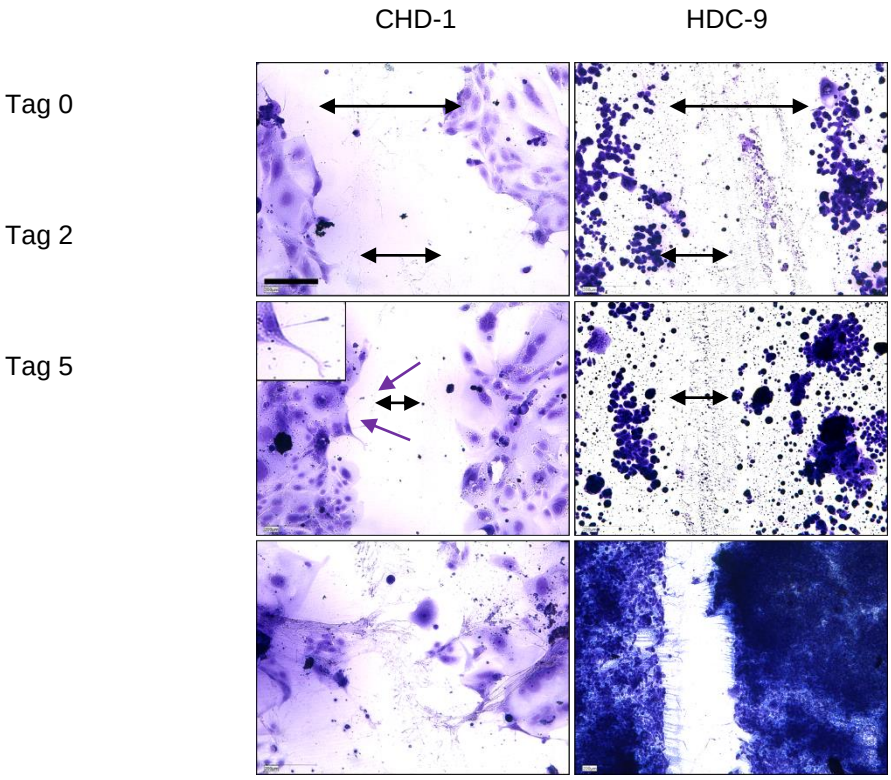

Abbildung 8: Scratch Assay

Scratch Assay der Zelllinien CHD-1 (linke Spalte) und HDC-9 (rechte Spalte). Die erste Zeile zeigt die Aufnahme bei Tag 0, die zweite Zeile bei Tag 2 und die letzte Zeile bei Tag 5. Die schwarzen Pfeile markieren den ungefähren Abstand durch die Scratches (die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant). Bei den CHD-1-Zellen ist, wie bereits erwähnt, die Bildung von Zellausläufern gut erkennbar (lila Pfeile).

Wir hatten uns erhofft im Scratch Assay zeigen zu können, dass die Zellen der Zelllinie CHD-1 schneller zusammenwachsen, als die der Linie HDC-9 und dies ein Hinweis auf die verbesserte Migrationsfähigkeit durch die *KRAS*-Mutation der CHD-1-Zellen sein könnte. Dies lässt sich jedoch in Scratch Assay so nicht darstellen. Man hat eher den Eindruck, dass die Zellen von HDC-9 deutlich dichter wachsen, die Lücke schließen sie jedoch auch nicht schneller. Die Morphologie

der Zelllinien ist sehr unterschiedlich, was sich in diesem Experiment deutlich zeigt, somit ist der Vergleich der Beiden in diesem Experiment nicht sinnvoll. Das sehr unterschiedliche Verhalten der Zelllinie in Bezug auf das Wachstum ist wohl eher auf die unterschiedliche Morphologie und intrinsische Wachstumsprogramme und nicht auf die *KRAS*-Mutation zurückzuführen.

3.3) Westernblot Abi1/PI3K

Aufbauend auf den Erkenntnissen von Steinestel et al. aus dem Jahr 2012, dass Abi-1 in CHD-1-Zellen stärker exprimiert wird als in den HDC-9-Zellen und dass die Applikation des PI3K-Inhibitors Wortmannin ($C_{20}H_{24}O_8$; 50nM, 72h) zu einer vollständigen Unterdrückung der Abi1-Expression führt, wollte ich untersuchen, ob zellulärer Stress (Entzug von Nährstoffen im Zellkulturmedium) auch Einfluss auf die Proteinexpression von Abi1 hat oder ob die Abi1-Überexpression in den CHD-1-Zellen im Vergleich zu den HDC-9-Zellen unabhängig von der Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren ist.

Beim Vergleich zwischen den Kultivierungsbedingungen der CHD-1-Linie (Serumentzug vs. kein Serumentzug) zeigte sich kaum ein Unterschied in der Abi1-Expression. Abi1 war unter Serumentzug-Zellen genauso stark exprimiert wie in den normal ernährten Zellen. Bei der HDC-9-Linie unter Serumentzug vs. ohne Serumentzug zeigte sich jedoch, dass die Expression von Abi1 in den im Serumentzug befindlichen Zellen schwächer war als in den normal versorgten Zellen (Abb. 9).

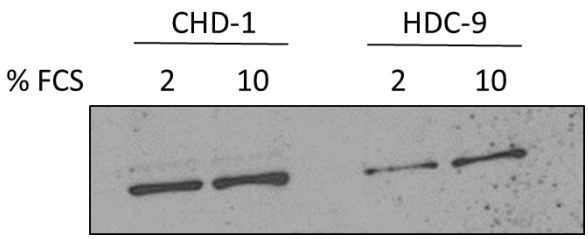

Abbildung 9: Western Blot mit Abi1 unter Serumentzug

Der direkte Vergleich zwischen CHD-1 und HDC-9 zeigt insgesamt eine stärkere Expression von Abi1 bei CHD-1. Beim Vergleich der in Serumentzug befindlichen CHD-1-Zellen (2% FCS) mit den normal versorgten CHD-1-Zellen (10% FCS) zeigt sich kaum ein Unterschied in der Expression von Abi1. Beim Vergleich der beiden HDC-9-Reihen zeigt sich die Expression unter Serumentzug-Zellen (2%) geringer als bei den normal versorgten Zellen.

3.4) Immunfluoreszenzfärbungen Abi1/PI3K

Im nächsten Schritt wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation von Abi1 und PI3K in den verwendeten Zelllinien mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. In den *KRAS*-mutierten CHD-1 Zellen schienen Abi1 und PI3K stärker im Zytosol als im Kern lokalisiert (Abb. 10). Insgesamt erschien das Färbesignal von Abi1 und PI3K in den nicht-mutierten HDC-9 Zellen etwas geringer, außerdem waren Abi1 und PI3K etwas weniger in der Zellperipherie vorhanden, sondern eher im Zentrum der Zelle und im Zellkern.

In beiden Zelllinien fiel jedoch an einigen Stellen eine Kolokalisation der beiden Proteine Abi1 und PI3K auf (Abb. 10, *merge*-Aufnahme), sowohl im Kern, als auch im Zytosol. Es zeigt sich aber auch, dass PI3K sowohl im Kern, als auch im Zytosol ohne Abi1 lokalisiert zu sein scheint (merge-Aufnahme HDC-9).

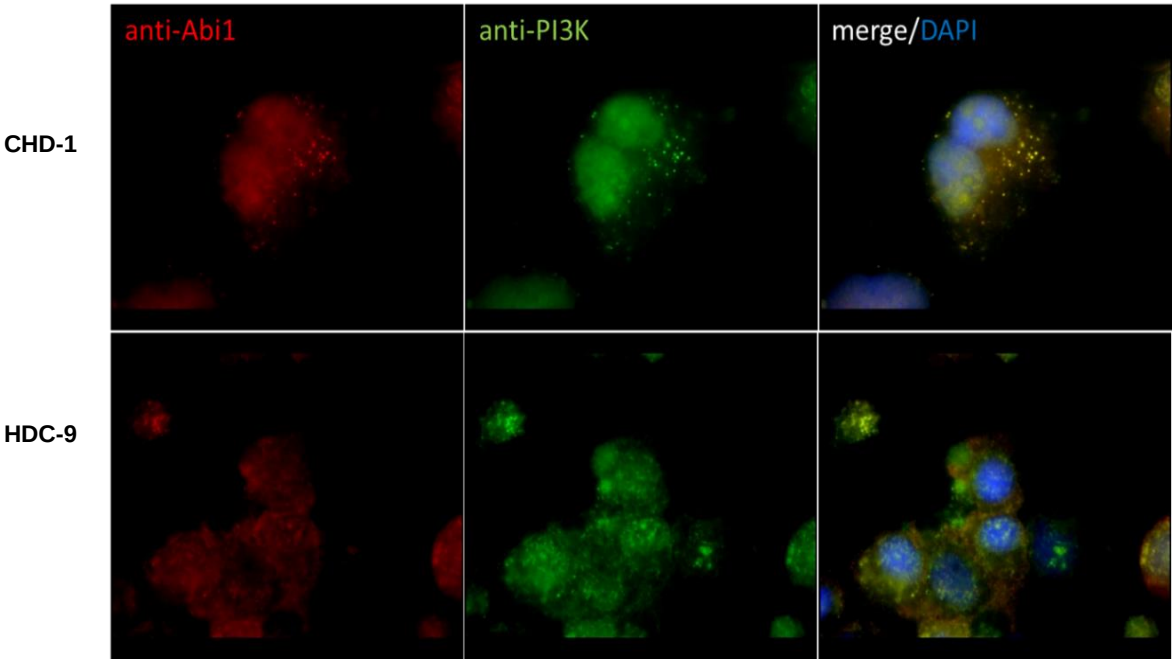

Abbildung 10: Doppel-Immunfluoreszenzzytologie in CHD-1 und HDC-9-Zellen
Antikörper gegen Abi1 (rot) und PI3K-p85 (grün). Anfärbung mit DAPI zur Darstellung der Zellkerne (blau). Das obere Panel zeigt die CHD-1-Zelllinie, die untere die HDC-9-Zelllinie. Man erkennt die bei CHD-1 im Zytosol lokalisierten Proteine Abi1 (rot) und PI3K (grün), eine gewisse Kolokalisation ist in der Merge-Aufnahme erkennbar. Bei den HDC-9-Zellen scheinen die beiden Proteine auch leicht verstärkt in den Zellkernen vorzukommen, aber auch hier lässt sich eine fokale Kolokalisation von Abi1 und PI3K feststellen. An einigen Stellen (sowohl im Kern, als auch im Zytosol) liegen die beiden Proteine aber auch getrennt voneinander vor. Abi1: Abelson-interactor Protein 1, PI3K Phosphoinositid-3-Kinase, DAPI: 4,6-Diamidino-2-Phenylindole

Ganz so deutlich wie erhofft ließ sich in der Immunfluoreszenzfärbung leider nicht zeigen, dass bei den mutierten CHD-1-Zellen die Proteine Abi1 und PI3K verstärkt in der Peripherie lokalisiert sind und dabei auch noch kolokalisiert vorliegen, was gut zu der Hypothese, der in der Peripherie stattfindenden Umgestaltung des Zytoskeletts gepasst hätte. Beide Proteine scheinen auch getrennt voneinander sowohl im Kern, als auch im Zytosol vorzukommen und dort bei verschiedensten Prozessen beteiligt zu sein.

3.5) Funktionelle Analysen

3.5.1) Behandlung mit STI571

Durch eine Behandlung der CHD-1-Zellen mit dem Tyrosinkinaseinhibitor STI571 (Imatinib, 10µM) über 24 Stunden wurde die Phosphorylierung von Abi1 über die Abelson-Tyrosinkinase (c-Abl) gehemmt, und ich konnte so zeigen, wie sich die Bildung der Zellfortsätze veränderte.

Die mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Kontrollzellen zeigten lamellipodienartige Ausläufer (Abb. 11, A-C). Abi1 und die am Tyrosinrest 435 phosphorylierte Isoform von Abi1 (Phospho-Abi1 Y435) kolokalisierte in diesen Zellen mit dem Klasse II-NPF Cortactin in der Zellperipherie, wo auch die Umgestaltung des Zytoskeletts zur Bildung der Zellausläufer stattfindet (Abb. 10, B und C). Die mit STI571 behandelten Zellen bildeten hingegen filopodienartige Ausläufer aus (Abb. 11, Bild D). Auch das Färbesignal von phosophoryliertem Abi1 (grün) zeigte sich bei den behandelten Zellen (Abb. 11, Bild D) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 11, Bild C) deutlich vermindert.

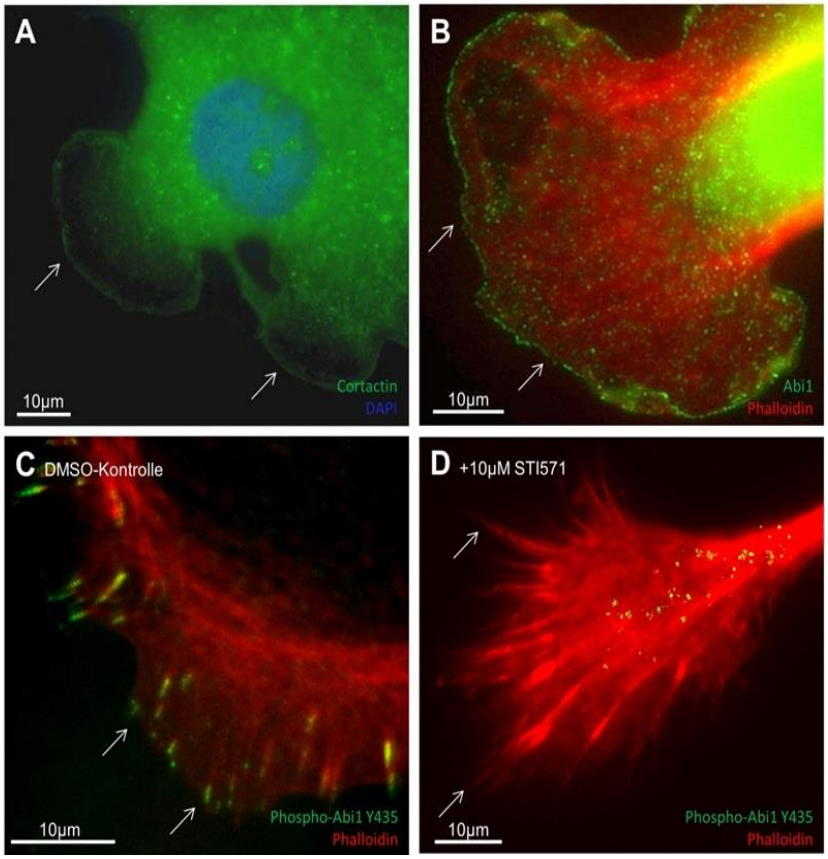

Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellfortsätze kolorektaler Karzinomzellen (CHD-1)

A und B, Lamellipodienartige Zellausläufer (Pfeilmarkierungen). In der Peripherie lassen sich Cortactin (A, grün) und Abi1 (B, grün) anfärben. C Es zeigt sich eine strangförmige Anfärbung mit einem phosphorylierungsspezifischen Antikörper (anti-Phospho-Abi1 Y435, grün) in Wuchsrichtung der breiten Zellfortsätze (Pfeilmarkierungen). D, Nach 24-stündiger Behandlung mit 10µM STI571 ist nur noch ein geringes Signal für das phosphorylierte Abi1 (Abelson-interactor Protein 1) zu sehen. Es zeigt sich nun außerdem ein deutliches Wachstum filopodienartiger Zellausläufer (Pfeilmarkierungen). (Bereits publiziert in Steinestel et al. 2013).

3.5.2) siRNA-Knockdown von Abi1

Die CHD-1 Zellen wurden nicht nur mit STI571 behandelt, sondern es wurde auch die Proteinexpression von Abi1 durch Transfektion mit Abi1-spezifischer siRNA vermindert. Der erfolgreiche Knockdown durch die Transfektion wurde durch Steinestel et al. bereits gezeigt (Steinestel et al. 2014). Anschließend wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, wie stark sich Lamellipodien oder Filopodien ausbilden.

Abbildung 12, Bild A zeigt die Lamellipodienbildung im Vergleich zwischen den Kontrollgruppen (1 und 2) zu den Zellen mit verminderter Abi1-Expression (3) und den mit STI571 behandelten Zellen (4). Bei den Zellen, bei denen weniger Abi1 vorhanden war bzw. bei denen die Phosphorylierung von Abi1 unterdrückt war, wurden signifikant weniger Lamellipodien ausgebildet (p-Wert bei den siRNA-Knockdown-Zellen von <0,001 und für die mit STI571 gehemmten Zellen von <0,01). Es fand bei diesen Zellen im Gegenzug eine deutlich stärkere Filopodienausbildung statt (Abb. 12, Bild B), die mit einem p-Wert von <0,001 für jene Zellen, bei denen weniger Abi1 vorhanden war bzw. bei denen die Phosphorylierung von Abi1 unterdrückt war, auch signifikant war.

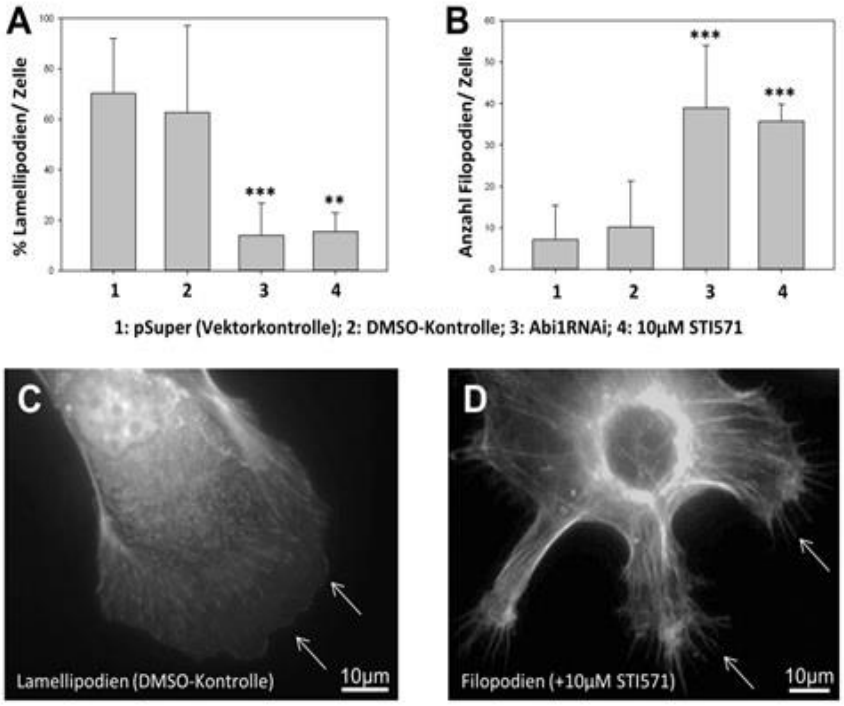

Abbildung 12: Effekt des Abi1-RNAi-Knockdowns sowie der Behandlung mit STI571 auf die Morphologie kolorektaler Karzinomzellen (CHD-1)

A, Nach Abi1-RNAi-Knockdown (3) oder Behandlung mit STI571 (4) zeigt sich eine signifikante Abnahme der lamellipodienartigen Zellausläufer im Vergleich zu den Kontrollzellen (Leervektor (1) bzw. DMSO-Kontrolle (2)). B, Nach Abi1-RNAi-Knockdown (3) oder Behandlung mit STI571 (Balken 4) zeigt sich eine signifikante Vermehrung der Zahl an Filopodien im Vergleich zur Leervektor (1) - bzw. DMSO-Kontrolle (2). C und D, repräsentative Abbildungen von Lamellipodien (DMSO-Kontrolle) sowie Ausbildung von Filopodien nach Behandlung mit 10µM STI571 für 24h. **p<0,01, ***p<0,001. Abi1: Abelson-interactor Protein 1 (bereits publiziert in Steinestel et al. 2013).

Bild C und D zeigen repräsentativ die Morphologie der Zellausläufer abhängig von der Abi1-Phosphorylierung am Tyrosinrest 435. Bei Hemmung von Abi1 über die Hemmung der Abl Tyrosinkinase mittels STI571 bilden sich Filopodien statt Lamellipodien aus.

Zusammenfassung:

Im Western Blot konnte ich zeigen, dass die *KRAS*-Mutation in kolorektalen Karzinomzellen zu einer verstärkten Expression von Abi1 führt.

Eine verstärkte Lokalisation in der Zellperipherie und eine Komplexbildung der Proteine Abi1 und PI3K durch die *KRAS*-Mutation konnte ich nicht deutlich darstellen, beide Proteine lagen sowohl im Kern, als auch in der Peripherie vor. Es gab Hinweise auf eine Komplexbildung, beide Proteine kamen aber auch einzeln voneinander vor.

Ein besseres Migrationsverhalten der mutierten CHD-1-Zellen im Scratch-Assay ließ sich leider auch so nicht zeigen.

Durch die Behandlung der CHD-1-Zellen mit dem Tyrosinkinaseinhibitor STI571 (Imatinib, 10µM) ließ sich jedoch eine Lamellipodienbildung unterdrücken und es bildeten sich verstärkt filopodienartige Zellausläufer. Dasselbe Ergebnis konnte durch den siRNA-Knockdown von Abi1 erreicht werden, auch hier bildeten sich Filopodien statt Lamellipodien. Dies lässt den Schluss zu, dass *KRAS*-mutierte kolorektale Karzinomzellen durch eine verstärkte Expression und auch Phosphorylierung von Abi1 die Fähigkeit zur Bildung von Lamellipodien und damit gegebenenfalls auch zur besseren Migration erhalten.

4.) Diskussion

4.1) Hintergrund

KRAS und Abi1 stellen zwei wichtige Proteine zur Regulation von Umbauvorgängen des Zellskeletts dar. Abi1 ist hierbei ein Zwischenschritt nach der Bindung von aktivierenden Liganden an den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR an der Zelloberfläche über die GTPase KRAS bis zu den Aktinnukleationsfaktoren N-WASP, WAVE1 und WAVE2. Diese Abläufe führen schließlich zur Ausbildung von lamellipodienartigen Zellausläufern, was für die Migration von Zellen entscheidend ist (Wang et al. 2007, Steinestel et al. 2012).

In mehreren Arbeiten wurde bereits der Zusammenhang einer verstärkten Abi1-Expression und der Bildung von Metastasen im Kolonkarzinom, im Ovarialkarzinom und auch für das Mammakarzinom beschrieben (Iwaya et al. 2007, Sun et al. 2009, Chen et al. 2010).

Für die *KRAS*-Mutation konnte in verschiedenen Studien ein Zusammenhang zwischen der Mutation und dem gehäuften Auftreten von Fernmetastasen gezeigt werden (Oliveira et al. 2007, Nash et al. 2010). In kolorektalen Karzinomen liegt die Inzidenz der *KRAS*-Mutation sogar bei ca. 35-45 % (Slattery et al. 2002, Lièvre et al. 2006).

Ein Interaktionspartner von Abi1 stellt PI3K dar, welche ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts einnimmt (Proepper et al. 2011, Kotula 2012). Es gibt Hinweise darauf, dass PI3K in der Signalkaskade zwischen KRAS und Abi1 liegt (Courtney et al. 2010).

In dieser Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen der kleinen GTPase KRAS und den Proteinen Abi1 und PI3K *in vitro* dargestellt werden. Dabei galt die Hypothese, dass die Abi1/PI3K-Interaktion in *KRAS*-mutierten Zellen zu einer veränderten Zellmorphologie führt. Ich ging davon aus, dass diese Veränderung durch eine erhöhte KRAS-abhängige Abi1-Expression bedingt sein könnte.

4.2) Expression von Abi1 und PI3K im kolorektalen Karzinom:

Im Western Blot konnte ich zeigen, dass in den CHD-1-Zellen, die eine *KRAS*-Mutation besaßen, die Expression von Abi1 stärker war, als in den HDC-9 Zellen (ohne *KRAS*-Mutation). Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass eine aktivierende Mutation im *KRAS*-Gen zu einer Überexpression von Abi1 führt. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass dies tatsächlich der Fall ist; so führte eine Transfektion von *KRAS*-Wildtyp-HDC9-Zellen mit G12D-mutiertem *KRAS* zu einer Heraufregulation von Abi1 auf Proteinebene (Steinestel et al. 2012).

Für PI3K ließ sich im Western Blot hingegen keine signifikante Abhängigkeit der Expression von der *KRAS*-Mutation darstellen. In anderen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine KRAS-Mutation direkt auf PI3K wirkt und PI3K an seiner katalytischen Untereinheit p110 auch mit KRAS direkt interagiert. (Courtney et al. 2010). Es besteht daher die Möglichkeit, dass PI3K in der Signalkaskade zwischen KRAS und Abi1 liegt. Es wäre auch möglich, dass KRAS ohne den Zwischenschritt über PI3K Abi1 direkt beeinflussen kann. In der Arbeit von Wang aus dem Jahr 2007 werden beide Wege von KRAS zu Abi1 postuliert, einmal über PI3K, jedoch auch ein direkter Weg von KRAS zur Abi1 (Wang et al. 2007). Allerdings konnte ich in meinen Untersuchungen nachweisen, dass die Hemmung der Kinaseaktivität von PI3K durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin die Abi1-Expression unterdrückt, was wiederum für die Annahme der Signalkaskade KRAS→ PI3K →Abi1 spricht.

Ich konnten zudem zeigen, dass die Überexpression von Abi1 in den *KRAS*-mutierten Zellen auch unter Serumentzug stabil war. Dies weist darauf hin, dass eine *KRAS*-mutierte Zelle auch mit wenig bis gar keiner Nährstoffversorgung arbeiten kann und dass die Überexpression von Abi1 durch die *KRAS*-Mutation erhalten bleibt. Hierdurch wird die Annahme unterstützt, wonach eine aktivierende *KRAS*-Mutation die Tumorzelle von der Regulation durch den EGF-Rezeptor und dessen Ligandenbindung entkoppelt, was eine Ursache dafür darstellt, dass *KRAS*-mutierte Kolonkarzinome resistent gegen EGFR-Antikörper (z.B. Cetuximab) sind (Karapetis et al. 2008, Lièvre et al. 2008, Bokemeyer et al. 2011).

Eine Studie aus dem Jahr 2000 konnte zeigen, dass Tumorzellen von verschiedenen Krebsarten ohne Nährstoffversorgung länger überlebten als Zellen aus gesundem Gewebe ohne Nährstoffversorgung (Izuishi et al. 2000).

Tumorzellen, aber auch gesunde Zellen, besitzen die Eigenschaft ihren Stoffwechsel unter schlechten Ernährungsbedingungen umzustellen. Dieser Effekt (sog. Warburg-Effekt, benannt nach dem Biochemiker Otto Warburg, der bereits in den 1920ern diese Hypothese aufstellte (Warburg et al. 1927, Warburg O. 1928)), postuliert, dass Zellen (vor allem Krebszellen) ihren Stoffwechsel von aerob (in Anwesenheit von Sauerstoff) auf anaerob (ohne Sauerstoff) umstellen können, hierbei wird Glucose vergärt und es entsteht Laktat. Die anaerobe Form der Energiegewinnung ist zwar nicht so effizient wie die aerobe, jedoch kann sie auch unter begrenzter Nährstoffversorgung stattfinden, was bei Tumorzellen oft der Fall ist (Bayley, 2012, Upadhyay et al. 2013, Chen et al. 2015).

4.3) Lokalisation von Abi1 und PI3K:

In der Immunfluoreszenzfärbung wollte ich zeigen, wo die beiden Proteine lokalisiert sind. Die Vermutung bestand darin, dass Abi1 und PI3K in der Zellperipherie zu finden sein müssten, da dort die Umgestaltung des Zytoskeletts stattfindet. Außerdem hätte dies in den *KRAS*-mutierten Zellen (CHD-1) noch stärker ausgeprägt sein müssen als in den nicht-mutierten Zellen (HDC-9). Auch eine Kolokalisation hatte ich vermutet, da beide Proteine ja miteinander agieren.
Beides ließ sich jedoch so nicht deutlich darstellen. Abi1 und PI3K kamen sowohl in der Zellperipherie als auch im Zellkern vor. Es gab eine gewisse Kolokalisation, jedoch lagen beide Proteine auch getrennt voneinander vor.
In der Arbeit von Stradal et al. konnte im Mausmodell allerdings gezeigt werden, dass Abi1 an den Rändern der Zellen lokalisiert ist und beim Umbau des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist. Auch für WAVE1, einen weiteren Interaktionspartner von Abi1, konnte gezeigt werden, dass dieser in der Zellperipherie lokalisiert ist (Stradal et al. 2001, Wang et al. 2007).
Die Arbeit von Innocenti und Kollegen beschreibt eine Komplexbildung von PI3K mit dem Abi1-Eps8-Sos-1-Komplex, um von Ras zu Rac das Aktin-Remodeling in Zellen herbei zu führen und so Ausläufer zu bilden. Dabei wird PI3K durch eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) an der Zelloberfläche aktiviert. PI3K besteht aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen (p85) Untereinheit. P85 interagiert mit der RTK, dadurch wird p110 aktiv und kann mit weiteren Proteinen

z.B. Ras interagieren. P85 kann nun auch mit Abi1 in einen Komplex bestehend aus Eps8, Abi1 und Sos1 eintreten und weitere Proteine, wie z.B. Rac aktivieren (Innocenti et al. 2003).

4.4) Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von Abi1

Ich konnte zeigen, dass bereits in der Durchlichtmikroskopie ein deutlicher Unterschied in der Morphologie der Zellen zwischen CHD-1 und HDC-9 bestand. Die *KRAS*-mutierten CHD-1-Zellen (mit einer stärkeren Abi1-Expression) neigten eher zur Ausbildung von Lamellipodien, die HDC-9-Zellen (mit weniger Abi1) eher zu Filopodien. Dies könnte einerseits zur der Hypothese passen, dass die Abi1-Expression und auch dessen Phosphorylierung entscheidend zur Ausbildung von Lamellipodien beitragen und sich in den nicht mutierten Zellen mit weniger Abi1 eher Filopodien ausbilden; andererseits könnte es auch nur an der sehr unterschiedlichen Morphologie der beiden Zelllinien liegen.
Im Scratch-Assay konnte leider nicht gezeigt werden, dass die *KRAS*-mutierten CHD-1-Zellen eine bessere Migrationsfähigkeit besitzen als die nicht-mutierten HDC-9-Zellen.
Durch die Hemmung der Phosphorylierung von Abi1 durch die Abelson-Tyrosinkinase (c-Abl) über den Tyrosinkinaseinhibitor STI571 (Imatinib) konnte jedoch bei den CHD-1-Zellen die Ausbildung von Filopodien statt Lamellipodien erreicht werden. Auch eine Arbeit von 2011 konnte zeigen, dass durch Zugabe von 10µM Imatinib zu Adenokarzinomzellen des Kolons die Zellen eher filopodienartige Ausläufer ausbildeten und auch die Migrationsfähigkeit der Zellen herabgesetzt war (Popow-Woźniaka et al. 2011).
Dies ließ sich auch durch den siRNA-basierten Knockdown von Abi1 bestätigen, es zeigte sich eine stärkere Ausbildung von Filopodien. Der Knockdown von Abi1 führte somit zu einem ähnlichen Phänotyp wie die Hemmung der Abelson-Tyrosinkinase durch STI571. Dies weist auf die wichtige Rolle der Expression und Phosphorylierung von Abi1 bei der Ausbildung von Lamellipodien hin.
In einer Arbeit von 2008 von Yu et al. wurde bei Ba/F3 Zellen in vitro ebenfalls ein Knockdown von Abi1 vorgenommen. Diese Zellen wurden dann anschließend in das Gefäßsystem von 6-8 Wochen alten NOD/SCID Mäusen (Non-Obese

Diabetic, Nicht-fettleibig-diabetisch; Severe Combined Immunodeficiency, schwerer kombinierter Immundefekt) injiziert. Nach dem Tod der Tiere wurden Zellen von Milz, Leber und Knochenmark untersucht und unter anderem für Migrationsassays verwendet. Es zeigte sich bei Untersuchungen sowohl in vitro bei Migrationsassays, als auch in vivo ein vermindertes Migrationsverhalten der Zellen (Yu et al. 2008). Leng et al. konnten das gleiche bei Melanomzellen feststellen. Bei den Zellen, bei denen Abi1 herunterreguliert war, war die Migrationsfähigkeit im Vergleich zu den Wildtypzellen deutlich verschlechtert (Leng et al. 2005).

Abi1 scheint somit ein wichtiger Faktor für die Ausbildung von Lamellipodien und somit der Bewegung der Zelle zu sein. Daraus könnte man ableiten, dass *KRAS*-mutierte kolorektale Karzinome mit starker Abi1-Expression durch die verstärkte Ausbildung von Lamellipodien eine bessere Migrationsfähigkeit erhalten. Eine prognostisch ungünstige Bedeutung für Tumoren mit einer hohen Zahl an lamellipodienartigen Zellausläufern wurde in der Literatur bereits beschrieben (Shinto et al. 2006).

In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Zellen, die nur Filopodien ausbilden, eher zu einer ungerichteten, uneffektiven Bewegung neigen (Bornschlögl 2013, Mellor 2010), bei Ausbildung von Lamellipodien jedoch eine gute Migrationsfähigkeit besteht (Le Clainche et al. 2008). Filopodien scheinen eher der Orientierung der Zelle zu dienen und können ihre Umgebung wie ein Sensor „wahrnehmen“ (Bornschlögl 2013).

An der Bildung von Filopodien sind unter anderem die kleinen Rho GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA38 beteiligt, aber auch WASP, ARP2/3 und WAVE2, obwohl WAVE2 bisher eher in Zusammenhang mit Lamellipodien gezeigt wurde. Hier zeigt sich, dass die GTPasen sicherlich mehrere Aufgaben in der Zelle und in der Signalübertragung besitzen und nicht eine GTPase nur für eine einzige Aufgabe bestimmt ist (Mattila et al. 2008).

Wang et al. konnte zeigen, dass durch eine stärkere Abi1 Expression eine erhöhte Invasion von Brustkrebszellen ermöglicht wird (Wang et al. 2007). Dies konnte auch schon für die Interaktionspartner von Abi1 NWASP und Arp2/3 gezeigt werden (Iwaya et al. 2007, Sun et al. 2009, Lin et al. 2014). Eine Studie aus dem Jahr 2010 untersuchte den Komplex aus SOS1, EPS8 und Abi1 und konnte zeigen, dass nur der komplette und intakte Tri-Protein-Komplex eine

Metastasierung hervorruft. Wenn nur eines der drei Bestandteile gehemmt wurde, war auch keine Metastasierung möglich. Dies wurde durch einen Knockdown jeweils eines Proteins in SK-OV3 und HEY Zellen gezeigt, die dann intraperitoneal in Mäuse injiziert wurden (Chen et al. 2010). Für SOS1 konnte gezeigt werden, dass es beim schlecht differenzierten Prostatakarzinom erhöht ist (Timofeeva et al. 2009). Eine starke Expression von EPS8 wurde beim fortgeschrittenen Stadium vom Pankreaskarzinom (Welsch et al. 2007), beim Plattenepithelkarzinom der Schleimhäute (Yap et al. 2009) und beim Hypophysentumor beobachtet (Xu et al. 2009).

Auch für KRAS wurde ein Zusammenhang zwischen der Mutation und dem Metastasierungsvermögen im kolorektalen Karzinom postuliert (Bos 1988, Oliveira et al. 2007). Oliveira et al. beschreiben beim kolorektalen Karzinom auch ein höheres Vorkommen von *KRAS*-Mutationen in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Primärtumor und auch bei den kolorektalen Karzinomen im TNM-Stadium III-IV war die Mutationsrate signifikant höher als im Stadium I-II. Eine Studie aus dem Jahr 2011 zeigte, dass durch die *KRAS*-Mutation eine stärkere Lymphknotenmetastasierung beim KRK erfolgt, besonders bei einer Mutation auf dem Codon 12 (Mannan 2011).

Ein Zusammenhang zwischen der KRAS-Mutation und einem kürzeren progressionsfreien Überleben oder kürzerem Gesamtüberleben konnte jedoch nicht gezeigt werden. Dies zeigt, dass eine Mutation alleine wahrscheinlich nicht ausreicht, sondern eher ein Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren vorliegen muss, damit ein Tumor besonders aggressiv ist (Zlobec et al. 2010, Roth et al. 2010, Steinestel et al. 2014).

Mittels der durchgeführten Untersuchungen in dieser Arbeit konnte ich herausstellen, dass Abi1 eine Rolle in der Veränderung des Aktinzytoskeletts und dadurch zur Bildung von Lamellipodien spielt. Wie genau sich dies abspielt und wie gewichtig die Rolle ist, konnte jedoch nicht klar gezeigt werden.

Durch eine Hemmung der Abelson-Tyrosinkinase durch den Abl-Tyrosinkinaseinihibitor Imatinib konnte die Funktion von Abi1 unterdrückt werden und dadurch entstanden eher filopodienartige Zellausläufer und keine Lamellipodien. Da jedoch die Abelson-Tyrosinkinase beim kolorektalen Karzinom keine Rolle spielt und auch die Signalkaskade von EGFR über KRAS zu PI3K und

Abi1 nicht der einzige Signalweg zur Bildung von Zellausläufern ist, ist die Gabe von Imatinib für das kolorektale Karzinom aktuell keine Therapiemöglichkeit.
Auch eine Hemmung von Abi1 alleine ist keine Therapiemöglichkeit, da außer dem Signalweg über Abi1 noch viele andere Signalwege zur Bildung von Zellausläufern existieren, z.B. der MAPK-Signalweg (Mitogen-activated Protein-Kinase). Dieser wird ebenfalls über den EGF-Rezeptor und Ras aktiviert. Anschließend erfolgt die Aktivierung von Raf und MEK und schließlich MAPK. Bei einer dauerhaften Aktivierung des MAPK-Signalwegs kommt es zur verstärkten Zellproliferation, die in der Entwicklung eines Karzinoms enden kann. Das Gen für Raf ist hierbei ein häufig mutiertes Gen, welches z.B. im malignen Melanom oder auch im Kolonkarzinom vorkommt (Santarpia et al. 2012, Cseh et al. 2014).
Der Ras/RAF/MEK Signalweg interagiert auch mit dem Ras/PI3K/Akt Signalweg (McCubrey et al. 2006), somit lassen sich die Signalwege nicht komplett voneinander trennen und eine Hemmung von einem Protein alleine reicht nicht aus, um die komplette nachfolgende Signalkette zu hemmen. Manche Kinasen, wie z.B. ERK (Extrazellular-signal-regulated Kinases) haben bis zu 160 verschiedene Interaktionspartner und führen über diese zu Transkription von Proteinen und auch Regulationen am Zellzyklus (McCubrey et al. 2006). Somit ist es auch nicht möglich ein oder zwei Proteine alleine zu betrachten und aus den Untersuchungen auf konkrete Abläufe zu schließen, da ein komplexes Zusammenspiel von vielen verschiedenen Faktoren vorliegt.

Abschließend möchte ich noch auf die großen morphologischen Unterschiede der beiden Zelllinien CHD-1 und HDC-9 eingehen. Die beiden Zelllinien stammen von unterschiedlichen Patienten und somit auch unterschiedlichen kolorektalen Karzinomen, die sich eben nicht nur in der *KRAS*-Mutation unterscheiden, sondern auch in vielen anderen Eigenschaften. Die Unterschiede im Verhalten, Morphologie und gegebenenfalls auch der Proteinexpression sind sicher nicht alleine auf die *KRAS*-Mutation zurückzuführen, sondern geben allenfalls Hinweise auf den Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen Abi1 und KRAS und deren Auswirkung auf die Zellmorphologie und damit das Migrationsverhalten.

4.5) Schlussfolgerung

Ich konnte zeigen, dass die *KRAS*-Mutation in kolorektalen Karzinomzellen zu einer verstärkten Expression von Abi1 führt und Abi1 in diesen Zellen auch eine Rolle bei der Ausbildung von Lamellipodien spielt.

Eine Komplexbildung zwischen Abi1 und PI3K in kolorektalen Karzinomzellen konnte ich nicht abschließend klären, auch zeigten sich nur geringe Hinweise auf eine verstärkte Kolokalisation der beiden Proteine durch die *KRAS*-Mutation. Auch ein verstärktes Vorkommen der Proteine in der Zellperipherie durch die *KRAS*-Mutation war nicht eindeutig darstellbar.

Abschließend lässt sich dennoch feststellen, dass *KRAS*-mutierte kolorektale Karzinomzellen durch eine verstärkte Expression und auch Phosphorylierung von Abi1 die Fähigkeit zur Bildung von Lamellipodien und damit wahrscheinlich zur Migration erhalten. Dies lässt den Schluss zu, dass die *KRAS*-Mutation einen pro-migratorischen Phänotyp der Tumorzelle unterstützt.

5.) Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom steht in Deutschland auf Platz drei der Todesursachen durch Krebserkrankungen. Aus diesem Grund besteht ein äußerst hohes Forschungsinteresse an Pathophysiologie, Therapiemöglichkeiten und Präventionsmaßnahmen. In den letzten Jahren hat sich die medizinische Forschung immer mehr auf die molekularbiologische Ebene verlagert und die Therapie mit Antikörpern ist bei vielen Tumorerkrankungen bereits ein etablierter Standard. Auch beim kolorektalen Karzinom existieren diese in Form von Antikörpern gegen Rezeptoren an der Zelloberfläche (z.B. EGFR- und VEGFR-Antikörper (Epidermal Growth Factor Receptor und Vascular Epidermal Growth Factor Receptor)).

In der Tumorgenese spielen Mutationen von Genen, die zu veränderten Proteinen führen, eine große Rolle. Auch KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) ist ein solches Protein. Die Mutation im *KRAS*-Gen erhöht jedoch nicht nur die Wahrscheinlichkeit, dass ein Karzinom entsteht, sondern auch, dass eine Metastasierung stattfindet. Studien konnten dies bereits bestätigen.

Damit ein Karzinom überhaupt Metastasen bilden kann, müssen in der Zelle verschiedene Umbauvorgänge des Aktinzytoskeletts stattfinden, um sogenannte Lamellipodien (Zellausläufer) zu bilden. Mit Hilfe dieser können sich Zellen fortbewegen. Ein Signalweg, der nun zu solchen Umbauvorgängen führt, ist der vom EGF-Rezeptor (aktiviert u.a. durch Wachstumsfaktoren) über KRAS, PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) und Abi1 (Abelson Interactor 1) bis zu WAVE-1 (WASP-family Verprolin-homologous Protein 1) und den Aktinnukleationsfaktoren, die in der Zellperipherie sitzen.

In dieser Arbeit sollte nun gezeigt werden, dass bei einer *KRAS*-Mutation, die zu einer stärkeren Abi1- und ggf. auch PI3K-Expression führt, die Zellen verstärkt Lamellipodien ausbilden und sich somit besser fortbewegen können.

In einer Immunfluoreszenzfärbung, im Scratch-Assay und im Western Blot wurden die Zellen zweier Zelllinien verglichen. Eine davon (CHD-1) besaß eine *KRAS*-Mutation auf dem Codon 13, die andere (HDC-9-Linie) nicht. Außerdem fand eine Behandlung der Zellen mit dem BCR-Abl-Inhibitor (Breakpoint Cluster Region-Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog-Inhibitor) STI571 (Imatinib) und ein Abi1-RNAi-Knockdown (Ribonucleic acid -Interferenz) statt.

In den einzelnen Experimenten konnte ich zeigen, dass in den *KRAS*-mutierten Zellen Abi1 stärker exprimiert wurde als in den nicht mutieren Zellen. Eine anfangs vermutete Komplexbildung von Abi1 und PI3K oder eine verstärkte Lokalisation der Proteine in der Zellperipherie durch die *KRAS*-Mutation ließ sich jedoch nicht darstellen.

Durch Hemmung von Abi1 durch den BCR-Abl-Inhibitor STI571 (Imatinib) und den Abi1-RNAi-Knockdown kam es allerdings statt zu einer Lamellipodien- zu einer Filopodienausbildung. Für Filopodien ist jedoch eher bekannt, dass sie der Orientierung der Zelle dienen und nicht der eigentlichen Bewegung. Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass *KRAS*-mutierte kolorektale Karzinomzellen durch eine verstärkte Expression und auch Phosphorylierung von Abi1 die Fähigkeit zur Bildung von Lamellipodien und damit gegebenenfalls auch zur Migration erhalten.

Abi1 ist allerdings nicht das einzige wichtige Protein in der Migration von Zellen beim kolorektalen Karzinom, somit ist die Hemmung oder der Knockdown von Abi1 alleine keine Therapiemöglichkeit. Es spielen außerdem noch viele andere Proteine, Wachstumsfaktoren und Kinasen eine Rolle bei der Migration und damit Metastasierung von Karzinomzellen, welche sich auch gegenseitig beeinflussen, was es schwierig macht, einen Effekt eines einzelnen Proteins für sich alleine zu untersuchen.

6.) Literaturverzeichnis

1. **Andreyev H. , Norman A., Cunningham D., Oates J., Dix B., Iacopetta B., Young J., Walsh T., Ward R., Hawkins N., Beranek M., Jandik P., Benamouzig R,. Jullian E., Laurent-Puig P., Olschwang S., Muller O., Hoffmann I., Rabes H., Zietz C., Troungos C., Valavanis C., Yuen S.:** Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study // British Journal of Cancer, 85: 692-696 (2001)
2. **Bayley J., Devilee P.:** The Warburg effect in 2012 // Current Opinion in Oncology, 24: 62-67 (2012)
3. **Bayrak R., Yenidunya S. and Haltas H.:** Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in colorectal adenocarcinomas // Pathology - Research and Practice - Journal, 207: 156-160 (2011)
4. **Berlau J., Glei M., Pool-Zobel B.:** Colon cancer risk factors from nutrition // Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378: 737-743 (2004)
5. **Beukers W., Hercegova A., Zwarthoff E.:** HRAS mutations in bladder cancer at an early age and the possible association with the Costello Syndrome // European Journal of Human Genetics, 22: 837–839 (2014)
6. **Bokemeyer C., Bondarenko I., Hartmann J., de Braud F., Schuch G., Zubel A., Celik I., Schlichting M., Koralewski P.:** Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study // Annals of Oncology, 22: 1535-1546 (2011)
7. **Bokemeyer C., Bondarenko I., Makhson A., Hartmann J., Aparicio J., de Braud F., Donea S., Ludwig H., Schuch G., Stroh C., Loos A., Zubel A., Koralewski P.:** Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin With and Without Cetuximab in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer // American Society of Clinical Oncology, 22: 1535-1546 (2009)
8. **Bornschlögl Thomas** How filopodia pull: What we know about the mechanics and dynamics of filopodia // Cytoskeleton, 70: 590-603 (2013)
9. **Bos Johannes L.** The ras gene family and human carcinogenesis // Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 195: 255-271 (1988)

10. **Bos Johannes. L.** Ras oncogenes in human cancer: a review // Cancer Research, 49: 4682-4689 (1989)
11. **Campbell S., Khosravi-Far R., Rossman K., Clark G., Der C.:** Increasing complexity of Ras signaling // Oncogene, 17: 1395-1413 (1998)
12. **Capella G., Cronauer-Mitra S,, Pienado M., Perucho M.:** Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors // Environmental Health Perspectives, 93: 125-131 (1991)
13. **Chalandon Y., Thomas X., Hayette S., Cayuela J., Abbal C., Huguet F., Raffoux E., Leguay T., Rousselot P., Lepretre S., Escoffre-Barbe M., Maury S., Berthon C., Tavernier E., Lambert J., Lafage-Pochitaloff M., Lhéritier V., Chevret S., Dombret H.:** Randomized study of reduced-intensity chemotherapy combined with imatinib in adults with Ph-positive acute lymphoblastic leukemia // Blood, 125: 3711-3719 (2012)
14. **Chauhan BK, Disanza A, Choi SY, Faber SC, Lou M, Beggs HE, Scita G, Zheng Y, Lang RA.:** Cdc42- and IRSp53-dependent contractile filopodia tether presumptive lens and retina to coordinate epithelial invagination // Development, 136: 3657-3667 (2009)
15. **Chen H., Wu X., Pan Z.P., Huang S.:** Integrity of SOS1/EPS8/ABI1 Tri-Complex Determines Ovarian Cancer Metastasis // Tumor and Stem Cell Biology, 70: 9979-9990 (2010)
16. **Chen X., Qian Y., Wu S.:** The Warburg effect: Evolving interpretations of an established concept // Free Radical Biology and Medicine, 79: 253-263 (2015)
17. **Chen Z., Lu W., Garcia-Prieto C., Huang P.:** The Warburg effect and its cancer therapeutic implications // Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 39: 267-274 (2007)
18. **Chetty R. and Govender D.:** Gene of the month: KRAS // Journal of Clinical Pathology, 66: 548-550 (2013)
19. **Cho Kathleen R. and Vogelstein Bert:** Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence // Cancer, 70: 1727-1731 (1992)
20. **Courtney K.D., Corcoran R.B., Engelmann J.A.:** The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer // Journal of Clinical Oncology, 28: 1075-1083 (2010)

21. **Cseh B., Doma E., Baccarini M.:** "RAF" neighborhood: Protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway // FEBS Letters, 588: 2398-2406 (2014)
22. **De Klein A., Hagemeijer A., Bartram C.R., Houwen R., Hoefsloot L., Carbonell F., Chan L., Barnett M., Greaves M., Kleihauer E.:** BCR rearrangement and translocation of the c-Abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia // Blood, 68: 1369-1375 (1986)
23. **Etienne-Mannevile Sandrine:** Microtubules in Cell Migration // Annual Review of Cell and Developmental Biology, 29: 471-499 (2013)
24. **Fearon ER.:** Molecular genetics of colorectal cancer // Annual Review of Pathology, 6: 479-507 (2011)
25. **Fearon Eric and Vogelstein Bert:** A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis // Cell, 61: 759-767 (1990)
26. **Freeman Spencer A. and Grinstein Sergio:** Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton // Immunological Reviews, 262: 193-215 (2014)
27. **Gambacorti-Passerini CB., Gunby RH., Piazza R., Galietta A., Rostagno R., Scapozza L.:** Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias // The Lancet Oncology, 4: 75-85 (2003)
28. **Goldfinger LE.:** Choose your own path: specificity in Ras GTPase signaling // Molecular Biosystems, 4: 293-299 (2008)
29. **Guerrero S., Casanova I., Farré L., Mazo A., Capellà G., Mangues R.:** K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression // Cancer Research, 60: 6750-6756 (2000)
30. **Hancock John F.:** Ras proteins: different signals from different locations // Nature Reviews Molecular Cell Biology, 4: 373-384 (2003)
31. **Heasman Sarah J. and Ridley Anne J.:** Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies // Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9: 690-701 (2008)
32. **Hossain S., Dubielecka PM, Sikorski AF, Birge RB, Kotula L.:** Crk and ABI1: binary molecular switches that regulate abl tyrosine kinase and signaling to the cytoskeleton // Genes and Cancer, 3: 402-413 (2012)

33. **Innocenti M., Frittoli E., Ponzanelli I., Falck J.R., Brachmann S.M., Di Fiore P.P., Scita G.:** Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1 and Sos-1 // Journal of Cell Biology, 160: 17-23 (2003)
34. **Innocenti M., Zucconi A., Disanza A., Frittoli E., Areces LB., Steffen A., Stradal TE., Di Fiore PP., Carlier MF., Scita G.:** Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex // Natural Cell Biology, 6: 319-327 (2004)
35. **Iwaya K., Oikawa K., Semba S., Tsuchiya B., Mukai Y., Otsubo T., Nagao T., Izumi M., Kuroda M., Domoto H., Mukai K.:** Correlation between liver metastasis of the colocalization of actin-related protein 2 and 3 complex and WAVE2 in colorectal carcinoma // Cancer Science, 98: 992-999 (2007)
36. **Izuishi K., Kato K., Ogura T., Kinoshita T., Esumi K.:** Remarkable Tolerance of Tumor Cells to Nutrient Deprivation: Possible New Biochemical Target for Cancer Therapy // Cancer Research, 60: 6201 (2000)
37. **Jing Liang, Lin C., Hu F., Wang F., Zhu L., Yao X., Wang Y., Zhao Y.:** APC Polymorphisms and the Risk of Colorectal Neoplasia: A huge Review and Meta-Analysis // American Journal of Epidemiology, 177: 1169-1179 (2012)
38. **Karapetis C.S., Khambata-Ford S., Jonker D., J. O'Callaghan C., Tu D., Tebbutt N.C., Simes R.J., Chalchal H., Shapiro J.D., Robitaille S., Price T.J., Shepherd L., Au H.J., Langer C., Moore M.J., Zalcberg J.R.:** K-ras mutations and benefit from Cetuximab in advanced colorectal cancer // New England Journal of Medicine, 59: 1757-1765 (2008)
39. **Kelleher FC und McArthur GA.:** Targeting NRAS in Melanoma // The Cancer Journal, 18: 132-136 (2012)
40. **Koretz K., Brüderlein S., Henne C., Fietz T., Laque M., Möller P.:** Comparative evaluation of integrin α-and β-chain expression in colorectal carcinoma cell lines and in their tumours of origin // Virchows Archive, 425: 229-236 (1994)

41. **Kotula Leszek:** Abi1, a critical molecule coordinating actin cytoskeleton reorganization with PI-3 kinase and growth signaling // FEBS Letters, 586: 2790-2794 (2012)
42. **Le Clainche C. und Carlier MF.:** Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration // Physiological Review, 88: 489-513 (2008)
43. **Le LQ. und Parada LF.:** Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs // Oncogene, 26: 4609-4616 (2007)
44. **Leduc C. und Etienne-Manneville S.:** Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects // Current Opinion in Cell Biology, 32: 102-112 (2015)
45. **Leng Y., Zhang J., Badour K., Arpaia E., Freeman S., Cheung P., Siu M., Siminovitch K.:** Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation // Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 102: 1098-1103 (2005)
46. **Leslie A., Carey FA., Pratt NR., Steele RJ.:** The colorectal adenoma-carcinoma sequence // British Journal of Surgery, 89: 845-860 (2002)
47. **Leube Rudolf E., Moch Marcin and Windoffer Reinhard:** Intermediate filaments and the regulation of focal adhesion // Current Opinion in Cell Biology, 32: 13–20 (2015)
48. **Lièvre A.**, **Bachet JB., Le Corre D., Boige V., Landi B., Emile JF., Côté JF., Tomasic G., Penna C., Ducreux M., Rougier P., Penault-Llorca F., Laurent-Puig P.:** KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer // Cancer Research, 66: 3992-3995 (2006)
49. **Lièvre A., Bachet JB., Boige V., Cayre A., Le Corre D., Buc E., Ychou M., Bouché O., Landi B., Louvet C., André T., Bibeau F., Diebold MD., Rougier P., Ducreux M., Tomasic G., Emile JF., Penault-Llorca F., Laurent-Puig P.:** KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab // Journal of Clinical Oncology, 26: 374-379 (2008)
50. **Lim KB., Bu W., Goh WI., Koh E., Ong SH., Pawson T., Sudhaharan T., Ahmed S.:** The Cdc42 effector IRSp53 generates filopodia by coupling

membrane protrusion with actin dynamics // Journal of Biological Chemistry, 283: 20454-20472 (2008)

51. **Lin YN., Izbicki JR., König A., Habermann JK., Blechner C., Lange T., Schumacher U., Windhorst S.:** Expression of DIAPH1 is up-regulated in colorectal cancer and its down-regulation strongly reduces the metastatic capacity of colon carcinoma cells // International Journal of Cancer, 134: 1571-1582 (2014)
52. **Mannan A. und Hahn-Strömberg V.:** K-ras mutations are correlated to lymph node metastasis and tumor stage, but not to the growth pattern of colon carcinoma // AMPIS, 120: 459-468 (2012)
53. **Mattila P.K. und Lappalainen P.:** Filopodia: molecular architecture and cellular functions // Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9: 446-454 (2008)
54. **Mauro MJ., O'Dwyer M., Heinrich MC., Druker BJ.:** STI571: a paradigm of new agents for cancer therapeutics // Journal of Clinical Oncology, 20: 325-334 (2002)
55. **McCubrey JA., Steelman LS., Chappell WH., Abrams SL., Wong EW., Chang F., Lehmann B., Terrian DM., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke J., Evangelisti C., Martelli AM., Franklin RA.:** Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance // Biochimica et Biophysica Acta, 1773: 1263-1284 (2006)
56. **Mejillano MR., Kojima S., Applewhite DA., Gertler FB., Svitkina TM., Borisy, GG.:** Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end // Cell, 118: 363-373 (2004)
57. **Mellor Harry:** The role of formins in filopodia formation // Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 1803: 191-200 (2010)
58. **Michio Ui, Taro Okada, Kaoru Hazeki, Osamu Hazeki:** Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase // Trends in Biochemical Sciences, 20: 303-307 (1995)
59. **Möller P., Koretz K., Leithäuser F., Brüderlein S., Henne C., Quentmeier A., Krammer P.H.:** Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium // International Journal of Cancer, 57: 371-377 (1994)

60. **Nash GM., Gimbel M., Shia J., Nathanson DR., Ndubuisi MI., Zeng ZS., Kemeny N., Paty PB.:** KRAS mutation correlates with accelerated metastatic progression in patients with colorectal liver metastases // Annals of Surgical Oncology, 17: 572-578 (2010)
61. **Oliveira C., Velho S., Moutinho C., Ferreira A., Preto A., Domingo E., Capelinha AF., Duval A., Hamelin R., Machado JC., Schwartz S. Jr, Carneiro F. and Seruca R.:** KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression // Oncogene, 26: 158-163 (2007)
62. **Popow-Woźniaka A., Woźniakowskaa A., Kaczmarekb L., Malicka-Błaszkiewicza M., Nowaka D.:** Apoptotic effect of imatinib on human colon adenocarcinoma cells: Influence on actin cytoskeleton organization and cell migration // Molecular and Cellular Pharmacology, 667: 66-73 (2011)
63. **Posch C. und Ortiz-Urda S.:** NRAS mutant melanoma – undrugable? // Oncotarget, 4: 494–495 (2013)
64. **Pritchard Robyn H., Shery Huang Yan Yan; Terentjev Eugene M.:** Mechanics of biological networks: from the cell cytoskeleton to connective tissue // Softmatter, 10: 1864-1884 (2014)
65. **Prives C. und Hall P.A.:** The p53 pathway // Journal of Pathology, 24: 2899–2908 (1999)
66. **Proepper C., Johannsen S., Liebau S., Dahl J., Vaida B., Bockmann J., Kreutz MR., Gundelfinger ED., Boeckers TM.:** Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation // EMBO Journal, 26: 1397-409 (2007)
67. **Proepper C., Steinestel K., Schmeisser MJ., Heinrich J., Steinestel J., Bockmann J., Liebau S., Boeckers TM.:** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k interats with Abi-1 at postsynaptic sites and modulates dendritic spine morphology // PLoS One, 6: e27045 (2011)
68. **Radich J.P.:** Measuring response to BCR-ABL inhibitors in chronic myeloid leukemia // Cancer, 118: 300-311 (2012)
69. **Ren J., Li G., Ge J., Li X., Zhao Y.:** Is K-ras gene mutation a prognostic factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis // Disease of Colon and Rectum, 55: 913-923 (2012)

70. **Resat Haluk, Ewald Jonathan A., Dixon David A., Wiley Steven H.:** An Integrated Model of Epidermal Growth Factor Receptor Trafficking and Signal Transduction // Biosphysical Journal, 85: 730-743 (2003)
71. **Rodriguez-Viciana, Warne PH., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry MJ., Waterfield MD., Downward J.:** Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras // Nature, 370: 527-532 (1994)
72. **Roth AD., Teipar S., Delorenzi M., Yan P., Fiocca R., Klingbiel D., Dietrich D., Biesmans B., Bodoky G., Barone C.:** Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial // Journal of Clinical Oncology, 28: 466-474 (2010)
73. **Santarpia L., Lippman S.L, El-Naggar A.L.:** Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy //Expert Opinion on Therapeutic Targets, 16: 103-119 (2012)
74. **Schmidt KL., Marcus-Gueret N., Adeleye A., Webber J., Baillie D., Stringham EG.:** The cell migration molecule UNC-53/NAV2 is linked to the ARP2/3 complex by ABI-1 // Development, 136: 563-574 (2009)
75. **Schnittler H.,Taha M., Schnittler MO., Taha A., Lindemann N., Seebach J.:** Actin filament dynamics and endothelial cell junctions: the Ying and Yang between stabilization and motion // Cell Tissue Research, 355: 529-543 (2014)
76. **Shah N., Guilhot F., Cortes J., Schiffer C., le Coutre P., Brümmendorf T., Kantarjian H., Hochhaus A., Rousselot P., Mohamed H., Healey D., Cunningham M., Saglio G.:** Long-term outcome with dasatinib after imatinib failure in chronic-phase chronic myeloid leukemia: follow-up of a phase 3 study // Bood, 123: 2317-2324 (2014)
77. **Shi Y., Alin K., Goff SP.:** Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity // Genes and Development, 9: 2583-2597 (1995)
78. **Shinto E., Jass JR., Tsuda H., Sato T., Ueno H., Hase K., Mochizuki H., Matsubara O.:** Differential prognostic significance of morphologic invasive markers in colorectal cancer: tumor budding and cytoplasmic podia // Diseases of Colon and Rectum, 49: 1422-1430 (2006)

79. **Sirvent A., Benistant C., Roche S.:** Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells // Biology of the Cell, 11: 617-631 (2008)
80. **Slattery ML., Curtin K., Schaffer D., Anderson K., Samowitz W.:** Associations between family history of colorectal cancer and genetic alterations in tumors // International Journal of Cancer, 97: 823-827 (2002)
81. **Steffen A., Rottner K., Ehinger J., Innocenti M., Scita G., Wehland J., Stradal TE.:** Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation // EMBO, 23: 749-759 (2004)
82. **Steinestel K., Bruderlein S., Lennerz JK., Steinestel J., Kraft K., Propper C., Meineke V., Moller P.:** Expression and Y435-phosphorylation of Abelson interactor 1 (Abi1) promotes tumour cell adhesion, extracellular matrix degradation and invasion by colorectal carcinoma cells // Molecular Cancer, 13: 145 (2014)
83. **Steinestel K., Bruderlein S., Steinestel J., Markl B., Schwerer MJ., Arndt A., Kraft K., Propper C., Moller P.:** Expression of Abelson interactor 1 (Abi1) correlates with inflammation, KRAS mutation and adenomatous change during colonic carcinogenesis // PloS One, 7:e40671 (2012)
84. **Steinestel K., Gläsle F., Brüderlein S., Steinestel J., Pröpper C., Möller P.:** Abelson interactor 1 (Abi1) im kolorektalen Karzinom // Der Pathologe, 34: 189-194 (2013)
85. **Steinestel K., Lennerz JK., Eder S., Kraft K., Arndt A.:** Invasion pattern and histologic features of tumor aggressiveness correlate with MMR protein expression, but are independent of activating KRAS and BRAF mutations in CRC // Virchows Archive, 465: 155-163 (2014)
86. **Stradal T., Courtney KD., Rottner K., Hahne P., Small JV., Pendergast AM.** The abl interactor proteins localize to sites of actin polymerization at the tips of lamellipodia and filopodia // Current Biology, 11: 891-895 (2001)
87. **Sun X., Li C., Zhuang C., Gilmore WC., Cobos E., Tao Y., Dai Z.:** Abl interactor 1 regulates Src-Id1-matrix metalloproteinase 9 axis and is required for invadopodia formation, extracellular matrix degradation and tumor growth of human breast cancer cells // Carcinogenesis, 30: 2109-2116 (2009)

88. **Timofeeva OA., Zhang X., Ressom HW., Varghese RS., Kallakury BV., Wang K., Ji Y., Cheema A., Jung M., Brown ML., Rhim JS., Dritschilo A.:** Enhanced expression of SOS1 is detected in prostate cancer epithelial cells from African-American men // International Journal of Oncology, 35: 751-760 (2009)
89. **Tumorregister München** Tumorregister München http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC1820G-ICD-10-C18-C20-Darmtumor-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf (2016)
90. **Tumorregister München** Tumorregister München http://www.tumorregistermuenchen.de/facts/surv20150519/surv_C18__G.pdf (2015)
91. **Upadhyay M., Samal J., Kandpal M., Singh O.V., Vivekanandan P.:** The Warburg effect: insights from the past decade // Pharmacology & Therapeutics, 137: 318-330 (2013)
92. **Vivanco I., Sawyers CL.:** The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer // Nature Reviews Cancer, 2: 489-501 (2002)
93. **Wang C., Navab R., Iakovlev V., Leng Y., Zhang J., Tsao MS., Siminovitch K., McCready DR., Done SJ.:** Abelson interactor protein-1 positively regulates breast cancer cell proliferation, migration and invasion // Molecular Cancer Research, 5: 1031-1039 (2007)
94. **Warburg O., Wind F., Negelein E.:** The metabolism of tumors in the body // The Journal of General Physiology, 8: 519-530 (1927)
95. **Warburg O.:** The chemical constitution of respiration ferment // Science, 68: 437-443 (1928)
96. **Welsch T., Endlich K., Giese T., Buchler MW., Schmidt J.:** Eps8 is increased in pancreatic cancer and required for dynamic actin-based cell protrusions and intercellular cytoskeletal organization // Cancer Letters, 255: 205-218 (2007)
97. **Werling R.W., Yaziji H., Bacchi C.E., Gown A.M.:** CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas // The American journal of surgical pathology, 27: 303-310 (2003)

98. **Weston A. und Godbold JH.:** Polymorphisms of H-ras-1 and p53 in breast cancer and lung cancer: a meta-analysis // Environmental Health Perspectives, 105: 919-926 (1997)
99. **Woodring P.J., Hunter T., Wang J.Y.J.:** Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases // Journal of Cell Science, 116: 2613-2626 (2003)
100. **Xu M., Shorts-Cary L., Knox AJ., Kleinsmidt-DeMasters B., Lillehei K., Wierman ME.:** Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 is overexpressed in human pituitary tumors: role in proliferation and survival // Endocrinology, 150: 2064-2071 (2009)
101. **Yap LF., Jenei V., Robinson CM., Moutasim K., Benn TM., Threadgold SP., Lopes V., Wei W., Thomas GJ., Paterson IC.:** Upregulation of Eps8 in oral squamous cell carcinoma promotes cell migration and invasion through integrin-dependent Rac1 activation // Oncogene, 28: 2524-2534 (2009)
102. **Yu W., Sun X., Clough N., Cobos E., Tao Y., Dai Z.:** Abi1 gene silencing by short hairpin RNA impairs Bcr-Abl-induced cell adhesion and migration in vitro and leukemogenesis in vivo // Cacinogenesis, 29: 1717-1724 (2008)
103. **Zhang C., Lv GQ., Yu XM., Gu YL., Li JP., Du LF., Zhou P.:** Current evidence on the relationship between HRAS1 polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis // Breast Cancer Research and Treatmen, 128: 467-472 (2011)
104. **Zlobec I., Bihl MP., Schwarb H., Terracciano L., Lugli A.:** Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis // International Journal of Cancer 127: 367-338 (2010)

Danksagung

Vielen Dank möchte ich all denjenigen sagen, die mich in den vergangenen Jahren bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Dr. Silke Brüderlein für die Betreuung, guten Tipps und Hilfe bei meinen Zellkulturen.

Prof. Peter Möller für die Möglichkeit an seinem Institut zu forschen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universität Ulm für die tolle Unterstützung.

Thomas Splettstößer für die Hilfe mit dem Design der Grafiken und Bilder.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. med. Dr. rer. nat. Konrad Steinestel, der unermüdlich Korrekturen vorgenommen und mich während der ganzen Zeit bei meiner Arbeit unterstützt hat.

Danken möchte ich auch all denjenigen, die mich seelisch und moralisch durch die letzten Jahre begleitet haben und nicht müde wurden mich zu motivieren, ganz besonders meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Freund Philipp und meinen Freunden.

Lebenslauf

Fenja Gläsle

*1987 in Bad Saulgau

Schulischer Werdegang:

1993-1997 Berta-Hummel Grundschule Bad Saulgau

1997- 2006 Störck-Gymnasium Bad Saulgau

Beruflicher Werdegang:

2007-2014 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm

Abschluss: Staatsexamen (16.05.2014)

Famulaturen:

01.08.2010 - 31.08.2010 Famulatur Innere Medizin BWK Ulm

09.03.2011 - 08.04.2011 Praxisfamulatur Dermatologie, Bad Saulgau

21.02.2012 - 21.03.2012 Famulatur Chirurgie, Christian Medical College, Vellore, Indien

16.04.2012- 27.04.2012 Famulatur Innere Medizin, Abt. Infektiologie, Uni Ulm

30.04.2012 – 15.05.2012 Famulatur Dermatologie Uni Ulm

PJ 2014:

erstes Tertial: Chirurgie, Steve Biko Academic Hospital, Universität Pretoria, Südafrika

zweites Tertial: HNO, BWK Ulm

drittes Tertial: Innere Medizin, BWK Ulm

Sept. 2014 bis Okt. 2016: Weiterbildungsassistentin Dermatologie und Venerologie, BwZK Koblenz

Ab Nov. 2016: Truppenarzt im Sanitätsversorgungszentrum Kastellaun

Wissenschaftlicher Werdegang:

07/ 2011 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Pathologie der Universität Ulm

11/2018 mündliche Prüfung der Dissertation

Eigene Publikation:

Steinestel K., Gläsle F., Brüderlein S., Steinestel J., Pröpper C., Möller P.:

Abelson interactor 1 (Abi1) im kolorektalen Karzinom. Von der synaptischen Plastizität zur Tumorzellmigration.

Der Pathologe 2013, 34:189–194