

**Die Analyse des molekularen
Mechanismus der Regulation der
Zellmigration durch Pals1**

von Christin Emming

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Die Analyse des molekularen
Mechanismus der Regulation der
Zellmigration durch Pals1**

von Christin Emming

aus Ahaus

München 2021

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München**

Lehrstuhl für Physiologie

**Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel**

**Angefertigt am: Universitätsklinikum Münster,
Abteilung für Medizinische Zellbiologie,
Medizinische Klinik und Poliklinik D**

**Mentor: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. rer. nat.
Michael Krahn**

**Gedruckt mit der Genehmigung der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin P. Märtlbauer

Univ.-Prof. Dr. Benedikt Sabaß

Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Priv.-Doz. Dr. Roswitha Dorsch

Tag der Promotion: 06.02.2021

*In Liebe, Wertschätzung und Dankbarkeit
widme ich meine Doktorarbeit
meiner Mutter, meinem Opa &
meiner verstorbenen Oma*

Inhaltsverzeichnis

1	Literaturübersicht.....	5
1.1	Das humane kolorektale Karzinom.....	5
1.1.1	Epidemiologie und klinische Symptome	5
1.1.2	Diagnose und Therapieoptionen.....	6
1.1.3	Onkogenese des kolorektalen Karzinoms.....	7
1.1.3.1	Die Adenom-Karzinom-Genese	7
1.1.3.2	Die epitheliale-mesenchymale-Transition	9
1.2	Epitheliale Zell-Zell-Kontakte.....	11
1.2.1	Allgemeiner Aufbau und Funktionen von Zell-Zell-Kontakten.....	11
1.2.2	Die Steuerung der Zellpolarität	13
1.2.3	Pals1 ist ein essentielles Adaptorprotein der <i>tight junctions</i>	15
1.2.4	Die Bedeutung von <i>tight junctions</i> in Bezug auf die Karzinogenese	17
1.3	Die Rolle von GTPasen	19
1.3.1	Die Organisation und der Aktivierungszyklus der kleinen GTPasen.....	19
1.3.2	Rac1 und Arf6 als maßgebliche Akteure bei der Zellmigration.....	20
1.3.3	SMAP1 ist eine spezifische GAP von Arf6.....	22
1.4	Das kolorektale Karzinom in der Tiermedizin	24
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	26
2	Material.....	28
2.1	Geräte und Gebrauchsgegenstände	28
2.2	Laborbedarf	30
2.3	Chemikalien und Reagenzien.....	31
2.4	Puffer und Lösungen.....	33
2.5	Enzyme	35
2.6	Kommerzielle Kits.....	35
2.7	Plasmid.....	35
2.8	CRISPR/Cas9 Konstrukte	36
2.9	Vektoren für GST-Pulldown-Assay.....	36
2.10	Sequenzierungsprimer.....	36
2.11	Antikörper.....	37
2.11.1	Primäre Antikörper	37
2.11.2	Sekundäre Antikörper	37
2.12	Bakterienstämme.....	37
2.13	Eukaryotische Zelllinien.....	38
2.14	Kommerzielle Zellkulturmedien	39

2.15	Software, Datenbanken, Suchmaschinen	39
3	Methoden.....	40
3.1	Zellbiologische Methoden	40
3.1.1	Kultivierung von verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien	40
3.1.2	Kryokonservierung von Zellen.....	41
3.1.3	Auftauen von Zellen	41
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl.....	41
3.1.5	Herstellung von Zelllysaten.....	42
3.1.5.1	Herstellung von Zelllysaten mit TNT-Puffer und Protease-Inhibitor..	42
3.1.5.2	Herstellung von Zelllysaten mit 1xLaemmli-Puffer.....	42
3.1.6	Migrationsassay	43
3.1.7	Invasionsassay	44
3.2	Das CRISPR/Cas9 System zur Etablierung von Knockout-Zelllinien	48
3.2.1	Einführung in das CRISPR/Cas9-System	48
3.2.2	Guide RNA Design (sgRNA sequences).....	49
3.2.3	Transfektion des CRISPR/Cas9-Plasmids.....	50
3.2.4	Selektion, Isolierung und Identifizierung der Knockout-Zellen.....	50
3.2.5	Gewinnung genomischer DNA.....	51
3.2.6	Genotypisierungs-PCR.....	51
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	53
3.2.8	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	53
3.2.9	Sequenzierung.....	53
3.3	Mikrobiologische Methoden	54
3.3.1	Transformation in <i>Escherichia coli</i>	54
3.3.2	Aufreinigung von Plasmid DNA.....	54
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	55
3.4.1	Proteinbestimmung mittels Bradford-Messung.....	55
3.4.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	55
3.4.3	Western Blot.....	56
3.4.4	Immundetektion durch spezifische Antikörper	57
3.5	GST-Pulldown-Assay.....	58
3.5.1	Grundlagen des GST-Pulldown-Assays	58
3.5.2	Expression und Aufreinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen in prokaryotischen Zellen	58
3.5.3	Durchführung des Pulldown-Assays	59
3.6	Statistische Datenauswertung.....	60
4	Ergebnisse	61

4.1	Verlust von Pals1 führt zu einer verstärkten Zellmotilität <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i> („Vorarbeiten“)	61
4.2	Charakterisierung von weiteren Pals1-Knockout Kolonkarzinomzelllinien in Bezug auf ihr onkogenes Potential	62
4.2.1	Analyse der Migrations- und Invasionskapazität	62
4.2.2	Rolle von Rac1 und Arf6 unter Verwendung des GST-Pulldown-Assays	65
4.3	Die Bedeutung von SMAP1 in Pals1-defizienten Zellen	69
4.4	Anwendung der CRISPR/Cas9-Mutagenese zur Analyse der Relevanz von Pals1 und SMAP1 auf die Tumorprogression	71
4.4.1	Inaktivierung von SMAP1 in DLD1 WT, DLD1 Δ Pals1	71
4.4.2	Inaktivierung von Pals1 in SW48 WT, LoVo WT	74
4.5	Untersuchung der etablierten DLD1-Knockout-Derivate	77
4.5.1	Analyse der Migrations- und Invasionsbereitschaft	77
4.5.2	Einfluss von Rac1 und Arf6 unter Verwendung des GST-Pulldown-Assays	79
4.6	Charakterisierung der generierten SW48 Pals1-Knockout-Zelllinie	83
4.6.1	Analyse der Migrations- und Invasionsbereitschaft	83
4.6.2	Einfluss von Rac1 und Arf6 unter Verwendung des GST-Pulldown-Assays	85
4.7	Charakterisierung der generierten LoVo Pals1-Knockout-Zelllinie	87
4.7.1	Analyse der Migrations- und Invasionsbereitschaft	87
4.8	Untersuchung der Pals1-Präsenz in den polymorphen Kolonkarzinomzelllinien	89
4.8.1	Analyse der Pals1-Expression in den DLD1-, RKO-, Caco-2-, SW48- und LoVo-Krebszellen	89
4.8.2	Evaluierung der Pals1-Expression in DLD1 Δ SMAP1	90
5	Diskussion	92
5.1	Die Relevanz von Pals1 auf die Onkogenese	92
5.1.1	<i>Tight junctions</i> -Komponenten sind in der malignen Zelltransformation involviert	92
5.1.2	Ein Pals1-Verlust wird über Arf6 in eine Rac1-induzierte Zellmigration reflektiert	93
5.1.3	Eine Pals1-Deletion in den DLD1-, RKO- und Caco-2 Δ Pals1-Zellen resultiert nicht in einer verstärkten Zellmigration	94
5.2	Das SMAP1-Protein kompensiert den Pals1-Verlust in den DLD1-, Caco-2-, RKO-Zelllinien	95
5.3	Die Analyse der kollektiven Abwesenheit von Pals1 und SMAP1 in Bezug auf die Tumorprogression	98
5.3.1	Die Charakterisierung der etablierten CRISPR/Cas9 Mutanten	98

5.3.2	Der simultane Verlust von Pals1 und SMAP1 resultiert in einer verstärkten Zellmotilität in den DLD1-Zellen	100
5.3.3	In den SW48-Zelllinien führt die Pals1-Deletion zu einer erhöhten Zellmigration	101
5.3.4	Die LoVo Δ Pals1-Zellen demonstrieren ein divergentes Zellmotilitätsverhalten	102
5.4	Die Evaluierung der polaren Morphologie der unterschiedlichen Kolonkarzinomzelllinien	103
6	Ausblick	105
7	Zusammenfassung	107
8	Summary	108
	Literaturverzeichnis	II
	Abbildungsverzeichnis	IX
	Tabellenverzeichnis	X
	Abkürzungsverzeichnis	XI
	Anhang	XIV
	Danksagung	XIV

1 Literaturübersicht

1.1 Das humane kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie und klinische Symptome

Das humane kolorektale Karzinom (KRK) ist in den letzten Jahrzehnten zu einer prävalenten Krebserkrankung geworden und es wird eine weitere Zunahme der Inzidenz prognostiziert [1]. Im Jahr 2018 wurde verzeichnet, dass das KRK weltweit die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen und die dritthäufigste bei Männern darstellt. Darüber hinaus wurden im Jahr 2018 weltweit schätzungsweise 1,8 Millionen neue Krankheitsfälle und 881.000 Todesfälle gemeldet [2, 3].

Das KRK lässt sich in Dickdarmkrebs (72 %) und Enddarmkrebs (28 %) unterteilen, wohingegen die Inzidenz in der Regel zusammen angegeben wird [4]. Im Allgemeinen kommt das Adenokarzinom mit mehr als 90 % am häufigsten vor, während andere Darmkrebstypen wie muzinöse Adenokarzinome, Siegelringzellkarzinome, Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse Karzinome und undifferenzierte Karzinome weniger frequent auftreten [5, 6].

Die Mehrzahl der Darmkrebsfälle (75 %) weisen keine offensichtlichen Hinweise auf eine hereditäre Komponente auf und sind in der Konsequenz sporadischer Natur. Im Kontrast dazu geben 25 % der Patienten an, dass ein Darmkrebsleiden in der Familiengeschichte bekannt ist. Nur 5-6 % der betroffenen Patienten mit familiärer Vorbelastung sind auf erbliche Keimbahnmutationen in relevanten KRK-Genen zurückzuführen [7]. In dieser Klasse lassen sich folgende Darmkrebskrankungen rubrizieren: die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) [8].

Darmkrebs steht in Verbindung mit einer Vielzahl von unspezifischen Symptomen, wie beispielsweise Müdigkeit, Gewichtsverlust, Kurzatmigkeit und Bauchschmerzen. Prägnantere Krankheitsanzeichen sind veränderte Darmgewohnheiten (Diarrhoe, Obstipation, Tenesmus) und Stuhlveränderungen (Hämatochezie, Meläna), die forciert auf ein malignes Geschehen hindeuten [1, 9]. Etwa 20 % der betroffenen Patienten weisen bei ihrer Vorstellung bereits Metastasen auf, mit Präferenz an folgenden Organen: regionale Lymphknoten, Leber, Lunge und Bauchfell [10].

1.1.2 Diagnose und Therapieoptionen

Die erste Wahl zur Diagnose von Darmkrebs ist die Darmspiegelung (Koloskopie). Ein CT-Bildgebungsverfahren von Brust-, Bauch- und Beckenbereich mit Kontrastmittel ist zudem relevant für eine konkrete Einstufung des Tumors in das TNM-Klassifizierungssystem [10]. Das von der UICC (*Union internationale contre le cancer*) erarbeitete TNM-System beschreibt das Stadium der Tumorerkrankung, unter Verwendung zureichender diagnostischer Daten, anhand der Ausbreitung des Tumors im Organismus [11]. Maßgeblich für die Stadieneinteilung sind die folgenden drei Bewertungskriterien: Größe des Primärtumors (T), Metastasierung in regionale Lymphknoten (N), Metastasierung in entfernte Organe (M) [6, 12]. Für die Klassifizierung von Darmkrebs existieren vier Stadien, wobei sich einzelne Stadien in verschiedene Unterstadien unterteilen lassen (I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IVA, IVB). Die Stadien I und II definieren sich lediglich über die lokale Ausbreitung des Primärtumors, während im Stadium III zusätzlich Metastasen in regionale Lymphknoten und im Stadium IV Fernmetastasen auftreten [4, 13].

Demgegenüber analysiert das Grading-System der WHO (*World Health Organisation*) den Differenzierungsgrad des Tumors anhand einer histologischen Untersuchung. Die Skala für die Tumoreinteilung erstreckt sich von G1 (gut differenziert) über G2 (mäßig differenziert) und G3 (schlecht differenziert) bis G4 (undifferenziert). Im Allgemeinen wird der Grad oft als „*low grade*“ (G1 oder G2) oder als „*high grade*“ (G3 oder G4) vereinfacht angegeben [4, 11].

Mithilfe der Einstufungssysteme kann das KRK suffizient evaluiert werden. Darüber hinaus bilden sie zudem eine Grundlage für ein individualisiertes Behandlungsverfahren und eine prognostische Einschätzung [11, 12].

Die chirurgische Entfernung des Tumorgewebes ist für Darmkrebs-Patienten, bei denen keine metastatische Streuung diagnostiziert wurde, die erfolgversprechendste Therapieoption [1]. Eine konkomitierende, neoadjuvante Chemotherapie ist bei einem lokal progressiven KRK angezeigt (Stadium I und II). Bei Darmkrebserkrankungen, die zudem Lymphknoten oder ferne Körperorgane betreffen (Stadium III und IV), ist eine adjuvante oder palliative Chemotherapie indiziert [10].

Die Eventualität einer Metastasierung des Primärtumors wirkt sich entscheidend auf die Prognose aus. Allgemein haben Patienten mit lokalisiertem Darmkrebs im Frühstadium (Stadium I und II) eine 5-Jahres-Überlebensrate von 90 %. Demgegenüber beträgt die Überlebensrate für Patienten mit KRK im Spätstadium (ab

Stadium III), bei dem bereits eine Ausbreitung der Krebszellen in entfernte Organe stattgefunden hat, nur 13,1 % [9].

1.1.3 Onkogenese des kolorektalen Karzinoms

1.1.3.1 Die Adenom-Karzinom-Genese

Die Pathogenese eines KRK wird weitestgehend durch genetische- und Umwelteinflüsse definiert [10]. Einerseits potenziert die erhöhte Teilungsrate der intestinalen Stammzellen innerhalb der DNA-Replikation die Wahrscheinlichkeit Mutationen zu erwerben und andererseits wirken sich Umwelteinflüsse wie Lebensstil und Ernährung auf die Transformation des Darmepithels aus [14]. Durch den Synergismus dieser Faktoren entstehen zunächst gutartige Tumore (Adenome), die sich zu bösartigen Tumoren (Karzinome) weiterentwickeln können (Adenom-Karzinom-Sequenz) [15]. Die maligne Tumorprogression wird primär auf molekularer Ebene durch Genmutationen und epigenetische Veränderungen vorangetrieben und wird als ein heterogener Prozess verstanden [1]. Genetische Modifikationen, die bei Darmkrebs zu lokalisieren sind, können in drei Hauptgruppen eingeteilt werden:

- 1) Chromosomeninstabilität (CIN),
- 2) Mikrosatelliteninstabilität (MSI),
- 3) CpG-Insel-Methylator-Phänotyp (CIMP) [7].

Die CIN wird in 85 % der sporadischen KRKs nachgewiesen und ist assoziiert mit Chromosomenaberrationen, die in einem Gewinn oder in einem Verlust von ganzen Chromosomen oder lediglich Chromosomenfragmenten resultieren [16]. Bereits 1990 beschrieben *Fearon* und *Vogelstein*, dass die CIN in Verbindung mit Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen steht [15, 17].

Die MSI tritt bei 15 % der sporadischen KRKs auf und kann in über 90 % der erblichen HNPCC assoziierten Darmkrebserkrankung nachgewiesen werden [18]. Mikrosatelliten sind kurze, sich tandemartig wiederholende DNA-Motive aus 1 bis 6 Nukleotiden, die *Hotspots* für Mutationen darstellen [19]. Vornehmlich werden Transformationen von Mikrosatelliten durch das DNA-*Mismatch*-Reparatursystem (MMR) korrigiert. Letztlich resultiert eine Mikrosatellitenmutation aus einer funktionellen Inaktivierung des MMR-Systems, die grundsätzlich als MSI bezeichnet wird [18]. Eine Mikrosatellitenmutation wird überwiegend durch eine Insertion oder Deletion von ein oder zwei Basenpaaren determiniert [20]. Als Konsequenz dieser

Mutation wird eine translationale Leserasterverschiebung (*Frameshift*) erzeugt, sodass die normale Proteinfunktion liquidiert oder stark transformiert wird [21]. Für die Standardisierung von MSI-positivem Krebs wurde 1997 in einem Workshop des *National Cancer Institute* (NCI) das sogenannte Bethesda-Panel konzipiert. Durch dieses System werden unter Verwendung von spezifischen Mikrosatelliten-Markern Tumorerkrankungen folgendermaßen kategorisiert:

- MSS: (Mikrosatellitenstabilität) keine Geninstabilität,
- MSI-niedrig: Instabilität an einem Genlocus,
- MSI-hoch: Instabilität an zwei oder mehr Genloci [22].

Grundsätzlich kann MSI als ein selektiver Prozess verstanden werden, in welchem die Inaktivierung bestimmter Zielgene im Zusammenhang mit Wachstumsvorteilen zugunsten der Tumorzellprogression steht [23]. Um ein umfassenderes Verständnis der Onkogenese zu erlangen und im Hinblick auf neue therapeutische Maßnahmen, zentriert die Krebsforschung ihren Blick auf die Identifizierung derartiger Zielgene [18]. MSI-positiver Krebs spricht beispielsweise weniger auf eine adjuvante 5-Fluorouracil-basierte Chemotherapie an, was die Forschungsrelevanz für MSI-positive Tumore untermauert [22]. *Woerner* und seine Mitarbeiter erstellten unter Verwendung von Regressionsberechnungen eine *Target*-Datenbank, welche stetig aktualisiert wird und die Konstatierung von Hauptakteuren der MSI-Tumorentstehung ermöglicht [18].

Die Art und das Spektrum von Genmutationen sind bei CIN- und MSI-Tumoren deutlich inkomparabel, was auf unterschiedliche, aber sich nicht gegenseitig prohibierende Prozesse der Onkogenese schließen lässt [23, 24].

Bei CIMP handelt es sich um einen epigenetischen Mechanismus, der vermutlich von 20-30 % aller KKR repräsentiert wird. CpG-Inseln sind Nukleinsäure-Bereiche, die eine hohe Frequenz von Cytosin-Guanin-Dinukleotiden enthalten und sich in der Nähe von Promotor-Regionen befinden [4]. Im Fall von CIMP erfahren die CpG-Inseln durch Methyltransferasen eine kovalente Addition von Methylgruppen (CH₃). Diese biochemische Modifikation resultiert in einer inhibierenden Genexpression und wird in Bezug auf die Onkogenese mit Tumorsuppressor-Genen assoziiert [17].

1.1.3.2 Die epitheliale-mesenchymale-Transition

Die maligne Progression von Darmkrebs impliziert, sekundär zur Adenom-Karzinom-Genese, die metastatische Ausbreitung von Krebszellen in umliegendes Gewebe und entfernte Organe [25]. Es wird geschätzt, dass 90 % der Krebstoten aufgrund der Folgen von Metastasen sterben, weshalb Metastasen als Hauptakteure für Morbidität und Mortalität von Krebs angesehen werden. Die Metastasierung kann als ein kaskadenartiger Prozess definiert werden, der die folgenden Schritte beinhaltet (s. Abb.1):

- Dissoziation der Krebszellen aus dem Tumorverband,
- Intravasation in das Kreislauf- und Lymphsystem,
- Extravasation an einer entfernten Endstrombahn,
- Zellmigration und Zellproliferation an einem entfernten Organ [26].

Bei der metastatischen Expansion spielt die epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT) eine fundamentale Rolle [27]. Die Krebszellen verlieren bei dem EMT-Prozess ihre epithelialen Eigenschaften, mitsamt ihrer Zellpolarität und hochspezialisierten Zell-Zell-Kontakte. Im Gegenzug entwickeln sie einen mesenchymalen Phänotyp, einschließlich der Fähigkeit zu einem mesenchymalen Migrationsverhalten. In diesem Zusammenhang wird den Krebszellen eine lokale und systemische Ausbreitung im Organismus ermöglicht [28-30]. Sobald die mesenchymale Krebszelle ihr entferntes Zielorgan erreicht hat, konvertiert sie zurück zum epithelialen Phänotyp und proliferiert zu einem Sekundärtumor (mesenchymale-epitheliale-Transition, MET) [31]. Der MET-Prozess wird durch komplexe regulatorische Netzwerke determiniert, die im Hinblick auf ihre Funktion in drei Gruppen kategorisiert werden:

- die Effektormoleküle, die den EMT-Prozess ausführen (EMT-Effektoren),
- die Transkriptionsfaktoren, die den EMT-Prozess koordinieren (EMT-Kernregulatoren), und
- die extrazellulären Indikatoren, die den EMT-Prozess aktivieren (EMT-Induktoren) [32, 33].

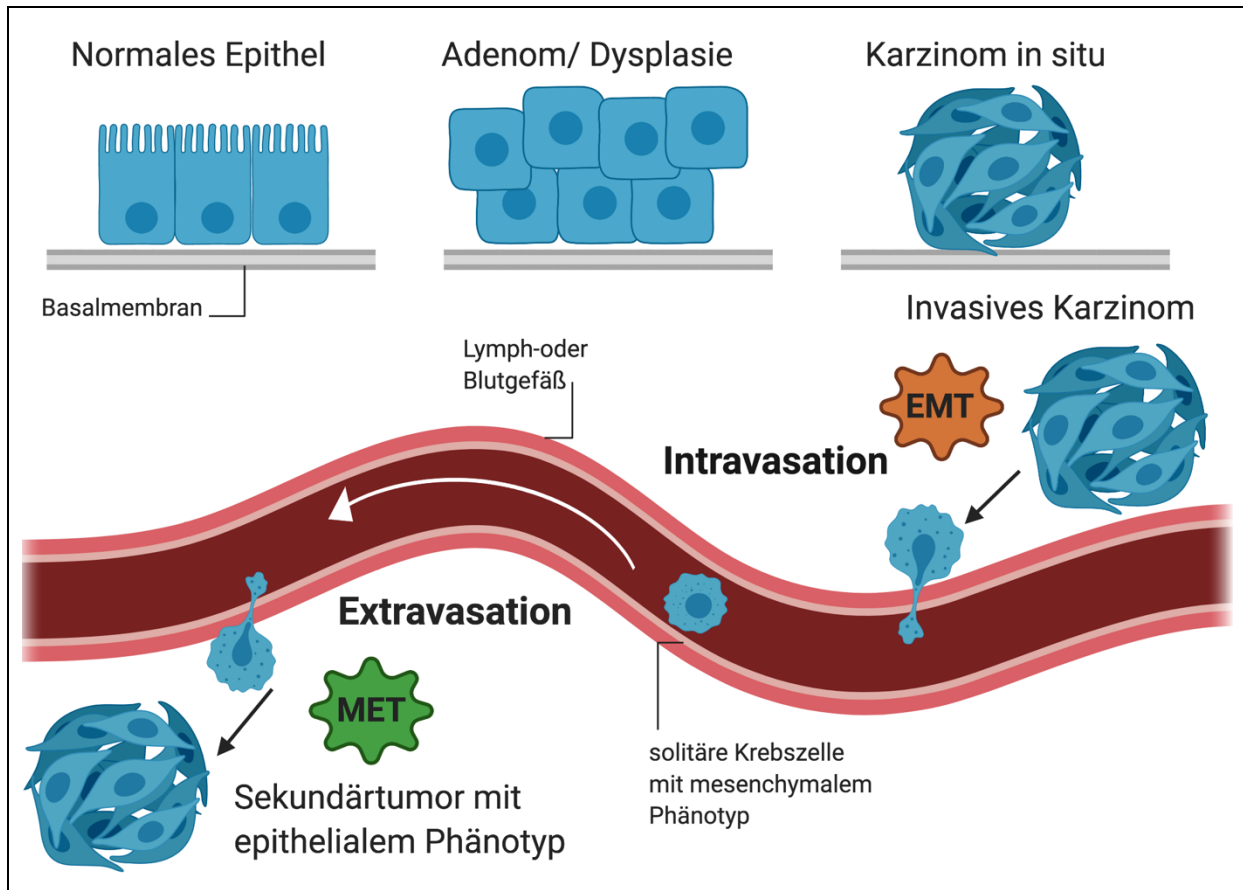


Abbildung 1: Schematisches Modell der epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT) bei der Metastasierung von Tumoren

Durch lokale Zellproliferation entsteht aus einem physiologischen Epithel ein Adenom. Genetische und epigenetische Veränderungen führen zu einer Progression des Adenoms zu einem Adenokarzinom in situ (Adenom-Karzinom-Sequenz). Weitere Mutationen können eine Ausbreitung von Krebszellen induzieren, möglicherweise durch eine EMT, bei dem die Zellen unter anderem Fähigkeiten wie Zelldissoziation und Zellmigration erlangen. Die Zellen penetrieren die Basalmembran und gelangen intravasal in die Blut- und Lymphgefäße. Es erfolgt ein passiver Transport und anschließend die Extravasation und Zellmigration in ein entferntes Organ. Unter Verwendung der MET können die solitären Krebszellen epitheliale Sekundärtumore ausbilden [27].

1.2 Epitheliale Zell-Zell-Kontakte

1.2.1 Allgemeiner Aufbau und Funktionen von Zell-Zell-Kontakten

In mehrzelligen Organismen sind Epithelien omnipräsent und stellen eine funktionelle Barriere dar, die unsere Organe und Gewebe von der äußeren Umgebung trennen [34]. Grundsätzlich bilden Epithelzellen organisierte und polarisierte Zellschichten mit charakteristischen Zellmorphologien und Gewebearchitekturen [35]. Jede einzelne Epithelzelle steht über hochspezialisierte Zell-Zell-Kontakte, welche entlang der seitlichen Zellmembran lokalisiert sind, in engem Kontakt mit ihren benachbarten Zellen [36]. Die Zell-Zell-Kontakte bilden einerseits extrazelluläre Verbindungen zwischen Nachbarzellen und andererseits intrazelluläre Verbindungen mit verschiedenen Zytoskelettkomponenten. Dadurch adhärieren die Zellen fest aneinander und es wird ein integriertes, strukturelles Kontinuum über das gesamte Epithelgewebe erzeugt [37]. Neben der Zelladhäsion definieren die Zell-Zell-Kontakte eine klare Grenze zwischen der apikalen Zellmembran (der Umgebung zugewandt) und der basalen Zellmembran (der Basalmembran zugewandt), wodurch sie der Epithelzelle eine intrinsische Zellpolarität verleihen [38]. Darüber hinaus fungieren die Zell-Zell-Kontakte als bidirektionale Signalknotenpunkte und koordinieren mehrere essentielle Zellprozesse wie Homöostase, Proliferation und Migration [35, 37]. Zu der Gruppe der Zell-Zell-Kontakte gehören *tight junctions* (TJ), *adherens junctions* (AJ), Desmosomen und *gap junctions*, wobei letzteres im Speziellen für die interzelluläre Kommunikation von Epithelzellen sorgen (s. Abb. 2) [39].

Die *tight junctions* (TJ) sind das apikalste Zellverbindungselement an der seitlichen Zellmembran und anlässlich ihrer Lokalisation wesentlich an der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt [40]. Zum einen trennen die TJ die apikale und die basolaterale Membran physikalisch voneinander (sogenannte Zaunfunktion) und zum anderen generieren TJ durch den Interzellularraum eine selektiv-durchlässige Diffusionsbarriere (sogenannte Barrierefunktion) [41]. Die architektonische Organisation von TJ umfasst einerseits Transmembranproteine, die entweder als Adhäsionsrezeptoren oder als parazelluläre Kanäle amtieren, und andererseits zytoplasmatische Proteine [42]. Die Transmembranproteine lassen sich rubrizieren in: *tetraspan* Transmembranproteine und *single-span* Transmembranproteine. Zu den *tetraspan* Proteinen zählen Claudin, Occludin und Tricellulin. Sie sind für die Bildung und selektive Steuerung der parazellulären Diffusionsbarriere verantwortlich. Die

single-span Proteine setzen sich zusammen aus: Adhäsionsproteinen der Immunglobulin-Superfamilie (JAM-A, -B, -C) und dem apikalen Polaritätsprotein, Crumbs3 (Crb3). Die JAM-Proteine regulieren die parazelluläre Transmigration von Leukozyten durch das Endothel und haben einen entscheidenden Einfluss auf die Zellpolarität, indem sie mit Komponenten des Par-Komplexes interagieren [37, 43].

Die zytoplasmatischen Proteine fungieren als ein komplexes Proteinnetzwerk, wobei Adaptorproteine, welche über mehrere Protein-Protein-Interaktionsmotive verfügen, die Hauptstrukturkomponente darstellen [44]. Zu den elementaren Adaptorproteinen zählen zum einen Mitglieder der membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUKs), wie Zona-Occludens-Proteine (ZO-1, ZO-2, ZO-3) und Pals1 (*protein associated with Lin Seven*) und zum anderen Multi-PDZ-Proteine, wie PATJ (*Pals1-associated tight junction protein*) und Par3/ Par6 (*partitioning deficient protein 3/6*) [45]. Indem einige Adaptorproteine einerseits mit den intrazellulären Domänen der Transmembranproteine assoziieren und andererseits mit F-Actin und Mikrotubuli interagieren, wird eine direkte Vernetzung der TJ mit dem Actin-Zytosklett organisiert. Darüber hinaus rekrutieren die Adaptorproteine verschiedene Arten von Signalproteinen. Zu den Signalproteinen lassen sich einerseits unterschiedliche Kinasen, Phosphatasen und Guanosintriphosphatasen (GTPasen) kategorisieren und andererseits transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulatoren [46]. Dieses zytoplasmatische Proteinnetzwerk transmittiert Signale aus dem Zellinneren, um den Zusammenbau und die Funktion der Verbindungselemente zu regulieren. Des Weiteren übertragen sie Signale von den Zell-Zell-Kontakten, welche für die Steuerung von verschiedenen zellulären Prozessen, wie Zellproliferation, Zellmigration, Differenzierung und Genexpression essentiell sind, in das Zellinnere [43, 46].

Unmittelbar unter den TJ sind die *adherens junctions* (AJ) lokalisiert [40]. Die AJ werden durch integrale Membranproteine der Cadherin-Familie charakterisiert, wobei das E-Cadherin in Epithelzellen am häufigsten vorkommt [47, 48]. Generell initiieren Cadherine eine starke Zelladhäsion, indem sie Transpaarungen mit Cadherin-Proteinen der gegenüberliegenden Zellen vermitteln. Darüber hinaus interagieren Cadherine mit zytoplasmatischen Proteine, insbesondere mit Mitgliedern der Cateninfamilie (ρ 120-Catenin, β -Catenin, α -Catenin), welche die Organisation des Aktin-Zytoskletts, die Cadherinstabilität und einige intrazelluläre Signalwege regulieren [48].

Die Desmosomen sind an der gesamten seitlichen Zellmembran lokalisiert und werden als das stärkste Zellverbindungselement eingestuft [49, 50]. Insgesamt werden Desmosomen als Calcium-abhängige Haftpunkte definiert, die zur Zelladhäsion beitragen, indem Transmembran-Cadherine (Desmogleine, Desmocolline) über Desmoplakine (Plakophilin, Plakoglobin) an Zwischenfilamente des Zytoskeletts gebunden werden [47].

Ivanov et al. beschreiben, dass insbesondere die TJ eine exzeptionelle Bedeutung bei der Instandhaltung der funktionsfähigen Epithelbarriere aufweisen, gleichwohl auch andere Verbindungselemente wie die AJ und die Desmosomen Zelladhäsionen vermitteln [51].

Gap junctions stellen zelluläre Kanäle dar, die über die gesamte seitliche Zellmembran verteilt sind. Zwischen benachbarten Zellen ermöglichen diese Kanäle den Durchtritt von Ionen und kleinen Molekülen [49]. Die Zell-Zell-Kommunikation, welche von den *gap junctions* realisiert wird, ist essentiell für die elektrische Transduktion, Signaltransmission und Ernährung. Die Kanäle werden grundsätzlich von Connexinen gebildet, von denen inzwischen über 20 Mitglieder beim Menschen identifiziert wurden, wobei Connexin43 das am häufigsten exprimierte Connexin darstellt [47].

1.2.2 Die Steuerung der Zellpolarität

Die Zellpolarität wird durch die asymmetrische Verteilung der Membrandomänen entlang der Zellachse determiniert [52, 53]. Ein Erkennungszeichen von Epithelzellen ist die apiko-basale Zell-Orientierung, die – wie bereits angeschnitten – folgendermaßen konstituiert ist:

- die apikale Membran ist dem Organlumen oder der äußeren Umwelt zugewandt,
- die laterale Membran steht in Kontakt mit der Nachbarzelle und versiegelt den Interzellularraum,
- die basale Membran berührt die extrazelluläre Matrix (ECM) [41].

Demgegenüber sind mesenchymale Zellen nicht polarisiert, berühren die Nachbarzelle nur fokal und sind nicht mit der Basalmembran assoziiert [36]. Die Akquisition der apiko-basalen Polarität von Epithelzellen ist für die physiologische Zellform, Zellproliferation und Zellfunktion, sowie für die Aufrechterhaltung der gesamten Gewebearchitektur von wesentlicher Bedeutung. In der Konsequenz stehen

Polaritätsdefekte in Verbindung mit pathologischen Erkrankungen, vornehmlich mit Krebs [52].

Es existieren drei große evolutionär konservierte Proteinkomplexe, die als zentrale Akteure für die Etablierung und Aufrechterhaltung der apiko-basalen Polarität eine fundamentale Rolle spielen. Die Polaritätskomplexe wurden ursprünglich in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* identifiziert und dazu zählen: der Crb3-Komplex (Crb3, Pals1, PATJ), der Par-Komplex (Par3, Par6, aPKC) und der Scribble-Komplex (Scrib, Lgl, Dlg) (s. Abb. 2) [54]. Wie bereits beschrieben, zählt Crb3 zu den *single-span* Transmembranproteinen, während Pals1 und PATJ zu den zytoplasmatischen Proteinen der TJ rekrutieren. Die Komponenten des Par-Komplexes gehören ebenfalls zu den zytoplasmatischen Proteinen der TJ und binden an die JAM-Proteine. Die Komplexe werden als dynamische Strukturen der TJ verstanden und interagieren einerseits miteinander und andererseits mit weiteren Elementen der Zell-Zell-Kontakte [43, 45].

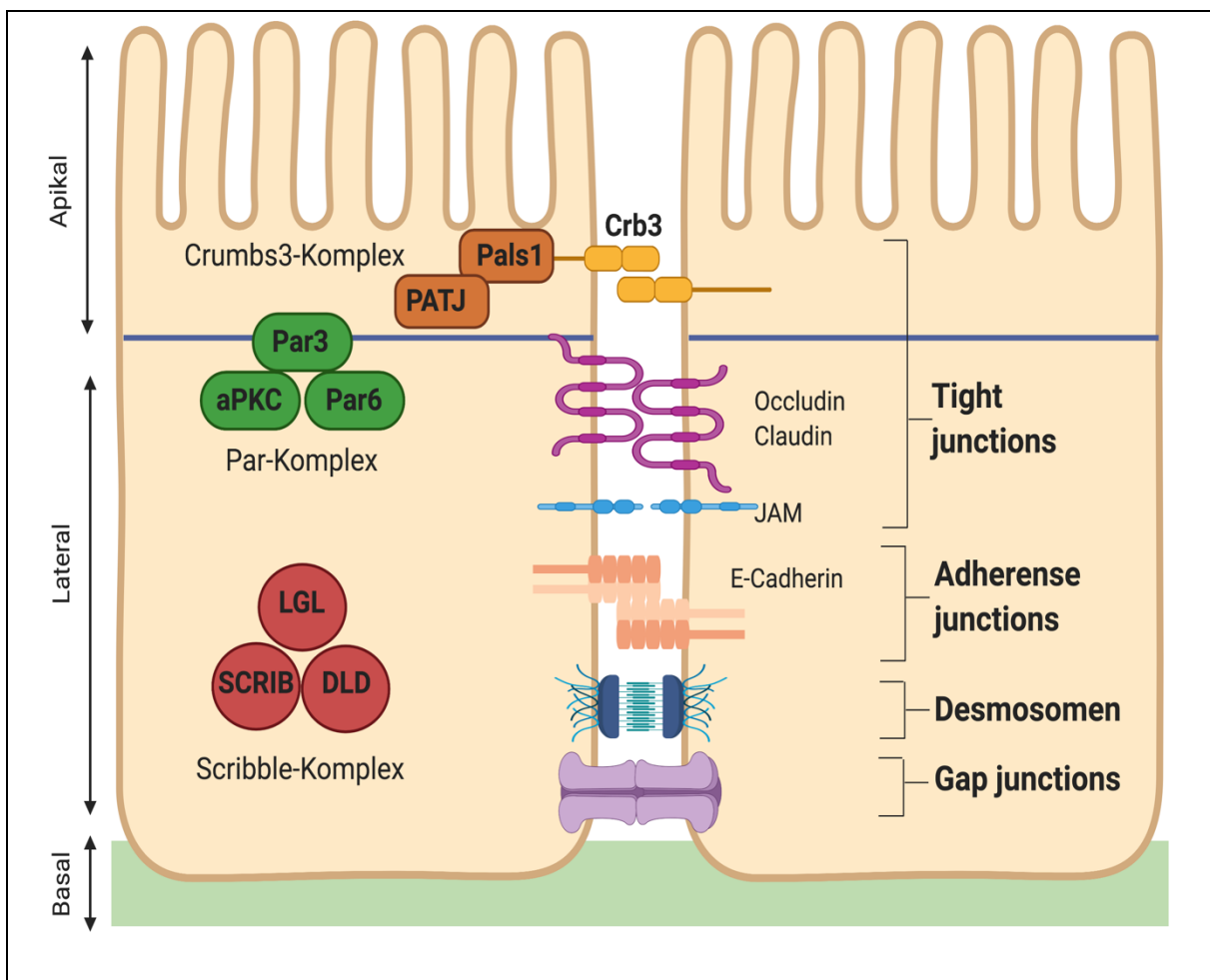


Abbildung 2: Komposition der epithelialen Zell-Zell-Kontakte

Die Zellkonnektivität wird durch diverse Zellverbindungselemente repräsentiert, dazu zählen *tight junctions*, *adherens junctions*, Desmosomen und *gap junctions* [35]. Insgesamt verfügt eine Epithelzelle über folgende Kontaktstellen: die apikale Membran, die mit der Umgebung in Kontakt steht, die laterale Membran, welche parazelluläre Räume versiegelt und die basale Membran, die an der ECM verankert ist [54]. Es existieren drei evolutionär konservierte Hauptmultiproteinkomplexe, die für die Herstellung einer epithelialen Polarisation verantwortlich sind. Der Crumbs3-Pals1-PATJ-Komplex ist für die Herstellung der Zellpolarität im apikalen Membranbereich verantwortlich, wohingegen der Par3-Par6-aPKC-Komplex die Etablierung der apiko-lateralen Membran generiert. Der Scrib-Dlg-Lgl-Komplex fungiert als Determinante der baso-lateralen Membrandomäne [55]. Verwendete Abkürzungen: aPKC: *atypical protein kinase C*, Scrib: *scribble*, Dlg: *discs large 1*, Lgl: *lethal giant larvae protein*

1.2.3 Pals1 ist ein essentielles Adaptorprotein der *tight junctions*

In Epithelzellen ist das Adaptorprotein Pals1 an den TJ lokalisiert, um den Crb3-Pals1-PATJ-Komplex zu konstituieren [56]. Pals1 ist evolutionär konserviert und seine Orthologen in *Drosophila* (*Stardust*, Sdt) und im Zebrafisch (*Nagie Oko*, Nok) regulieren gleichermaßen die epitheliale Zellpolarität [57]. Des Weiteren ist das Pal1-Protein der MPP-Familie (*membrane palmitoylated protein*) angeschlossen und wird durch das MPP5-Gen (*membrane palmitoylated protein 5*) kodiert. Die MPP-Familie ist ferner bekannt als p55-Unterfamilie der MAGUKs [58, 59]. Pals1 besteht aus 675 Aminosäuren, die in den folgenden funktionellen Domänen organisiert sind: eine GUK-Domäne (Guanylatekinase), eine 4.1-Bindedomäne (4.1. BD), eine SH3-Domäne (Src Homology 3), eine PDZ-Domäne und zwei L27-Domänen. Die NH₂-terminale Region mit 125 Aminosäuren verfügt über keine Ähnlichkeit mit anderen Protein-Motiven und wird daher als U1-Domäne deklariert (unbekannte Domäne 1) [60, 61]. Das integrale Membranprotein Crb3 umfasst eine extrazelluläre Domäne (ECD), eine Transmembranregion (TM) und eine intrazelluläre Domäne (ICD). Die ICD-Domäne beinhaltet ebenfalls eine PDZ-Domäne, welche an die Pals1-PDZ-Domäne bindet. Durch diese direkte Interaktion wird Pals1 an die apikale Membran rekrutiert, wobei Crb3 abermals von Pals1 stabilisiert wird [58]. Die L27-Domäne von Pals1 heterodimerisiert mit der L27-Domäne von PATJ, sodass eine Konnektivität von PATJ an die TJ gegeben ist (s. Abb. 3) [62]. Darüber hinaus assoziiert die N-terminale U1-Region von Pals1 mit der PDZ-Domäne von Par6, wodurch eine unmittelbare Verbindung zwischen dem Crb3- und dem Par-Komplex realisiert wird [57, 58].

Durchgeführte Knockdown-Studien in Säugetier-Epithelzellen illustrierten, dass ein Pals1-Defizit zu einer gestörten TJ-Bildung in Kombination mit schwerwiegenden Polaritätsdefekten führt [63, 64]. Zugleich beschrieben *Wang et al.* eine abweichende

E-Cadherin-Lokalisation, da ein Pals1-Verlust den Transport von E-Cadherin zur Zellperipherie stört, sodass infolgedessen auch die AJ-Bildung obstruiert wird [64]. Zusammenfassend kann assertiert werden, dass Pals1 eine essentielle Rolle bei der Etablierung und Regulierung von TJ und AJ spielt. Dennoch sind weitere physiologische Funktionen und mögliche Auswirkungen bei einer Deregulation oder einem Verlust von Pals1 relativ unbekannt.

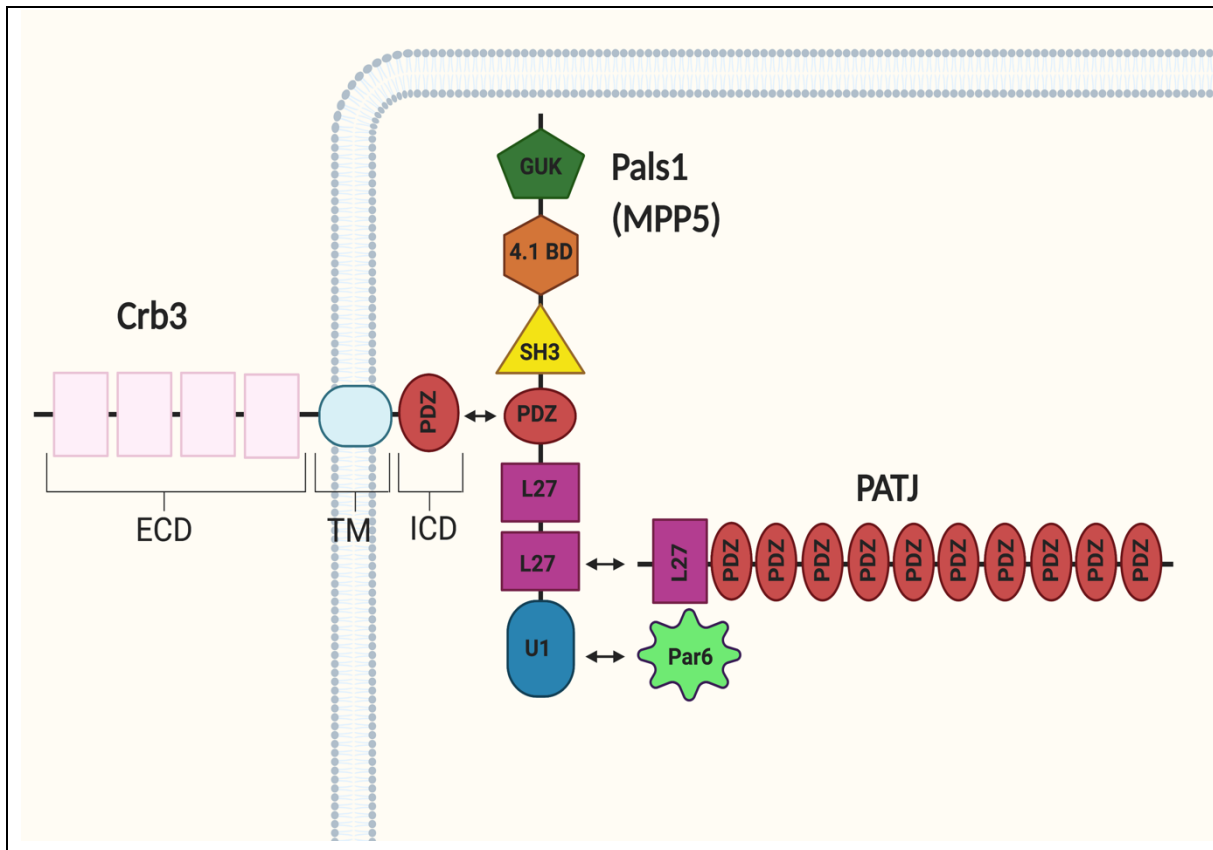


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Crb3-Pals1-PATJ-Komplexes in Verbindung mit den unterschiedlichen funktionellen Bindungsdomänen

Das Transmembranprotein Crb3 verfügt über eine extrazelluläre Domäne (ECD), eine Transmembranregion (TM) und eine intrazelluläre Domäne (ICD). Crb3 interagiert mit seiner intrazellulären PDZ-Domäne mit der Pals1-PDZ-Domäne, sodass Pals1 an die apikale Membran rekrutiert wird. Die L27-Domäne von Pals1 bindet wiederum an das L27-Motiv von PATJ, wodurch PATJ ebenfalls an die TJ assoziiert ist. Darüber hinaus interagiert die U1-Domäne von Pals1 mit Par6, wodurch Pals1 eine direkte Verbindung zwischen dem Crb3- und dem Par-Komplex realisiert.

1.2.4 Die Bedeutung von *tight junctions* in Bezug auf die Karzinogenese

Epithelzellen stellen mit circa 90 % das überwiegende Ursprungsgewebe der meisten Krebserkrankungen dar. In der Regel ist Krebs gekennzeichnet von einem ungebremsten Zellwachstum, einer Gewebedesorganisation und einem Verlust der Zellpolarität [65, 66]. Generell sind dezimierte epitheliale Zell-Zell-Kontakte für neoplastische Epithelzellen charakteristisch. Aus diesem Grund und angesichts der elementaren Bedeutung von Polaritätsproteinen bei der Herstellung der Zellpolarität in Epithelgeweben, wird speziell diesen Determinanten eine tumorsupprimierende Funktion zugesprochen [65].

Lin et al. erstellten Polaritäts-Expressionsprofile, welche aufzeigten, dass Polaritätsproteine über krebsspezifische Genexpressionsmodifikationen verfügen, die eine Tumorprogression suggestiv beeinflussen können und zudem mit der Tumormalignität korrelieren [67]. Eine weitere Studie belegt, dass deregulierte TJ wichtige Signalwege bei der Onkogenese, entweder direkt oder indirekt durch die Rekrutierung von Signalproteinen, steuern. Bei Mamma-, Prostata-, Ovarien-, Endometrium-, Bronchial-, hepatozellulären und kolorektalen Karzinomen konnte eine Dysregulation von TJ eruiert werden [68]. Die Dysregulation der TJ resultiert aus verschiedensten Modifikationsmöglichkeiten. Dazu zählen: Mutationen, Proteinüberexpression, Proteinunterexpression, alternatives *Spleißen* und fehlerhafte Proteinlokalisierung [69]. Es gibt Hinweise, dass einige Krebserkrankungen mit expliziten Expressions- und Lokalisierungsveränderungen von Adaptorproteinen der TJ assoziiert sind [34]. In diesem Zusammenhang berichten *Bell* und *Thompson*, dass die maligne Transformation von einem intestinalen Adenom zu einem Adenokarzinom im Verbindung steht, mit einem progredienten Verlust von Mitgliedern des apikalen Crb3-Pals1-PATJ-Komplexes [70].

Des Weiteren werden TJ eine Rolle bei der Metastasierung zugesprochen, indem sie die EMT instruieren [68]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der E-Cadherin-Repressor ZEB1 verschiedene Polaritätsproteine unter anderem Crb3 und PATJ herunterreguliert, wodurch eine Tumorprogression in Assoziation mit einer EMT verstärkt wurde [71]. Insgesamt deuten die literaturbasierten Daten darauf hin, dass eine TJ-Fehlfunktion bzw. Dysregulation einen Einfluss auf die Tumorentstehung hat und zusätzlich eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung spielt [72].

Zusammengenommen können TJ-Proteine als zelluläre Ziel-Onkogene angesehen werden.

1.3 Die Rolle von GTPasen

1.3.1 Die Organisation und der Aktivierungszyklus der kleinen GTPasen

Die Ras-Superfamilie kleiner GTPasen umfasst eine Gruppe molekularer Schalter, die an nahezu allen biologischen Zellbereichen beteiligt sind und somit eine exorbitante Relevanz in der Wissenschaft einnehmen [73]. Die Ras-Superfamilie lässt sich im Hinblick auf die Sequenz und die funktionelle Ähnlichkeit der GTPasen in fünf Hauptgruppen einteilen: Ras, Rho, Rab, Ran und Arf [74]. Die Proteine besitzen alle eine GTP-Bindungsdomäne von circa 20 kDa, welche auch als G-Domäne bekannt ist [75]. Mitglieder der Ras-Superfamilie sind Schlüsselregulatoren für zahlreiche Zellprozesse wie Steuerung des Zytoskeletts, Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Vesikel- /Organellendynamik und -transport [73]. Die GTPasen liegen entweder in einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand vor oder existieren in einem aktiven GTP-gebundenen Zustand, in dem die GTPasen mit nachgeschalteten Effektoren interagieren [76]. Im Allgemeinen wird die Schaltfunktion der GTPasen durch GTPase-aktivierende-Proteine (GAPs), Guanin-Nukleotidaustauschfaktoren (GEFs) und Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) katalysiert [77]. Die Hydrolyse von GTP und damit die Inaktivierung der GTPasen wird durch GAPs gefördert. Demgegenüber realisieren GEFs die GTPasen-Aktivierung, indem sie die Freisetzung von GDP in Assoziation mit einer GTP-Bindung stimulieren [42]. Die GDIs sequestrieren die kleinen GTPasen in einen inaktiven Komplex, welcher bei einem bestimmten Stimulus dissoziiert, sodass die GTPasen freigesetzt werden und anschließend durch GEFs aktiviert werden können [78]. Für Arfs wurden im Gegensatz zu den Rab- und Rho GTPasen keine GDIs identifiziert [79].

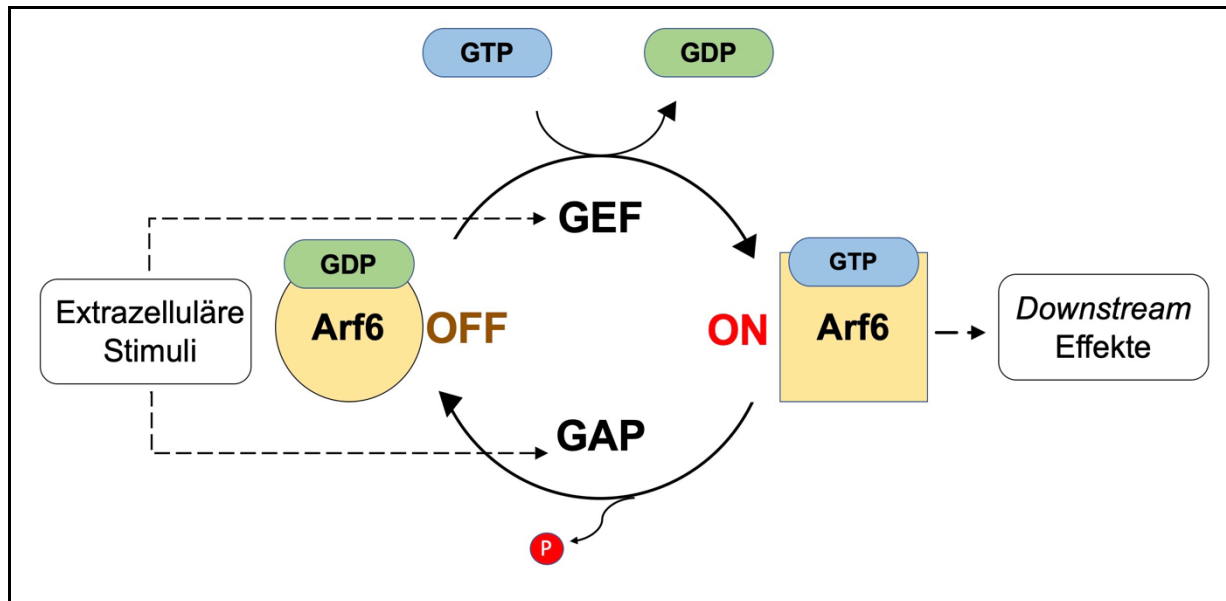


Abbildung 4: Der Aktivierungszyklus der GTPasen am Beispiel von Arf6

GTPasen wechseln zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen und einer aktiven GTP-gebundenen Konformation. Dieser Zyklus wird einerseits durch GEFs reguliert, die das GDP gegen GTP austauschen und somit Arf6 aktivieren. Demgegenüber fördern GAPs die Hydrolyse von gebundenem GTP zu GDP und induzieren folglich eine Inaktivierung [42]. Aktivierte GTPasen interagieren mit den nachgeschalteten Effektorproteinen und stimulieren nachfolgend eine Vielzahl von Zellprozessen [77]. Die Dynamik der GEFs und GAPs wird durch extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren, bioaktiven Lipiden und Chemokinen gesteuert [80].

1.3.2 Rac1 und Arf6 als maßgebliche Akteure bei der Zellmigration

Die Ras-homologe Familie (Rho) ist eine Untergruppe der Ras-Superfamilie und umfasst 20 verschiedene intrazelluläre Schlüsselmoleküle, wobei Rac1, RhoA und Cdc42 derzeit die am besten untersuchten Proteine darstellen [42]. Grundsätzlich fungieren Rho-GTPasen als Regulatoren für sämtliche Zellaufgaben, einschließlich Zellform, Zellmotilität, Endozytose, Exozytose, Zell-Zell-Adhäsion und Zytokinese [81]. Das Rac1-Protein wird ubiquitär exprimiert und wurde erstmalig als *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* im Jahre 1989 entdeckt [77, 82]. GTP-gebundenes Rac1 assoziiert mit der Plasmamembran, wohingegen inaktives zytosolisch prävaliert [83]. Zu den zellulären Funktionen von Rac1 gehört im Speziellen die Initiierung der Zellmigration, aber auch die Stimulation der Zellproliferation, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Partizipation bei der TJ-Regulation und bei der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion [84].

Generell handelt es sich bei der Zellmigration um eine aktive Zellbewegung gemäß einer Lokomotionsveränderung, die physiologisch (Embryogenese, Wundheilung)

oder auch pathologisch (Onkogenese) sein kann [52]. Um zu migrieren, muss die Zelle ihre physiologische Form und Starrheit modifizieren und die ECM als Barriere passieren [85]. Die Zellmigration beginnt mit der Verlängerung der Zellvorderkante, die durch eine Actin-Polymerisation vermittelt wird, wobei sogenannte Pseudopodien (z.B. Lamellipodien, Filopodien) transient gebildet werden [30]. Im Anschluss erfolgt eine Zellkörperkontraktion, woraus eine Zugkraft resultiert, die das sukzessive Vorwärtsgleiten des Zellkörpers realisiert [85]. Rac1 spielt eine essentielle Rolle bei der Lamellipodien-Bildung, indem sich Rac1-GTP an der Zell-Vorderkante lokalisiert und dort die Actin-Polymerisation stimuliert [86]. Des Weiteren steuert Rac1 die Expression von verschiedenen Matrixmetalloproteinasen, die für den proteolytischen Abbau der ECM erforderlich sind [87].

Die Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor-Familie (Arf) gehört ebenfalls der Ras-Superfamilie an und inkludiert sechs verschiedene Arf-Proteine, die anhand ihrer Aminosäuresequenz in drei Klassen eingeteilt werden: Klasse I (Arf1, Arf2 und Arf3), Klasse II (Arf4, Arf5) und Klasse III (Arf6) [88]. Der ADP-Ribosylierungsfaktor 6 (Arf6) wird omnipräsent exprimiert, ist auf der Plasmamembran und im endozytischen System lokalisiert und operiert in einer Vielzahl von Zellsignalwegen [89]. Dazu gehört die Steuerung von Aktin-Zytosklettveränderungen, als auch die Endozytose von Vesikeln aus der Plasmamembran und das Recycling von Endosomen zur Membran [90, 91]. Durch die Rekrutierung und das Recycling von Endosomen, werden wichtige Proteine rehabilitiert, die für die Zell-Zell-Adhäsion und Zellmigration benötigt werden [79].

Eine Vielzahl von Daten belegen, dass Rac1 und Arf6 häufig bei malignen Neoplasien überexprimiert sind und eine essentielle Rolle bei der unkontrollierten Zellmigration und -invasion spielen [89, 92, 93]. In diesem Kontext fanden *Sanger et al.* heraus, dass in Mammakarzinomen und Melanomen die aktive Arf6-Menge mit der Tumoraggressivität korreliert, was den Einfluss von Arf6 bei der Tumorphorprogression asseriert [94]. Weitere Studien zeigen zudem, dass die Überexpression von Rac1 und Arf6 nicht im Zusammenhang mit einer verstärkten Transkription steht, sondern auf einen posttranskriptionellen Effekt zurückzuführen ist [30, 93, 95]. *Bosco et al.* beschreiben, dass dereguliertes Rac1 die Lamellipodien-Bildung in Krebszellen verstärkt, wodurch die Krebszell-Migration gefördert wird. Des Weiteren verändert Rac1 die Transkriptionsaktivität von Matrixmetalloproteinasen, sodass die Krebszellen

in das Blut- oder Lymphgefäßsystem invasieren und sich metastatisch ausbreiten können [86].

Darüber hinaus verzeichnen mehrere bereits veröffentlichte Daten eine dynamische Protektion zwischen Arf6 und Rac1 [83, 96, 97]. Anhand von Pulldown-Assays und Koimmunopräzipitation veranschaulichten *Cotton et al.*, dass Arf6-GTP vornehmlich direkt mit Rac1-GDP interagiert [97]. Wie oben erwähnt, reguliert Arf6 den endosomalen Membranhandel und miteingeschlossen ist die polarisierte Abgabe von Rac1 an die Vorderkante von migrierenden Zellen [79, 92]. *Radhakrishna* und seine Mitarbeiter beschreiben, dass eine Kolo-kalisation von Arf6 und Rac1 an der Plasmamembran existiert. Des Weiteren zeigten sie in Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen, dass Arf6 die Rac1-vermittelte protrusive Aktivität verstärken und eigenständig durch die Interaktion mit Aktin-regulierenden Proteinen die kortikale Aktin-Struktur verändern kann. Dementsprechend ist Arf6 ein elementarer *upstream*-Regulator für eine Rac1 bedingte Zellmigration [83, 98]. Letztlich hat die isolierte Funktion und insbesondere die strategische Zusammenarbeit der GTPasen eine exorbitante Bedeutung auf die Karzinogenese, mit Augenmerk auf eine verstärkte Zellmigration und -invasion.

1.3.3 SMAP1 ist eine spezifische GAP von Arf6

Das *stromal membrane associated protein 1* (SMAP1) besteht aus einer konservierten Arf-GAP-Domäne, einem Zinkfinger vom Typ C4, einer Clathrin-Domäne und einer CALM- (Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukämie) Domäne [88, 94]. *Tanabe et al.* konnten zeigen, dass SMAP1 als eine spezifische GAP für Arf6 fungiert [99]. Das SMAP1-Protein kann direkt mit Clathrin interagieren und reguliert die Clathrin-abhängige Endozytose von E-Cadherin und des Transferrin-Rezeptors [100, 101]. E-Cadherin ist ein zentrales Element der AJ, wohingegen Transferrin einen zellwachstumsfördernden Faktor darstellt. Zusammengenommen kann eine Rolle von SMAP1 bei Zellwachstum, -differenzierung und -organisation manifestiert werden. Überdies konstatierten *Kon et al.*, dass in MDCK-Zellen eine SMAP1-Überexpression eine inhibitorische Wirkungskraft auf die Zellmigration und die EMT hat [100].

Das SMAP1-Gen verfügt über eine kodierende 10-Adenin-Wiederholung, die aufgrund der Mononukleotid-Wiederholungen prädisponiert für MSI ist [94]. In 1.1.3. wurde bereits die Target-Datenbank von *Woerner et al.* aufgeführt, die anhand von

Regressionsberechnungen mögliche Akteure der MSI-Tumorentstehung verzeichnet [18]. In Bezug auf das SMAP1-Protein validiert die Datenbank, dass von 223 Darmkrebsproben insgesamt 107 Proben eine SMAP1-Mutation im 10-Adenin-Trakt aufweisen, was auf eine Mutationshäufigkeit von 48 % schließen lässt. Darüber hinaus besitzen 56 % von 23 etablierten Krebszelllinien eine SMAP1-Mutation im besagten Wiederholungstrakt [102].

Sanger et al. führten eine Studie des SMAP1-Gens durch, die 46 etablierte Krebszelllinien beinhaltete, welche ihren Ursprung aus unterschiedlichen Geweben hatten (Gaster, Kolon, Endometrium, Lymphom). Die Analyse zeigte, dass SMAP1-Mutationen ausschließlich in MSI-Tumoren zu lokalisieren sind und darüber hinaus am häufigsten in Kolonkarzinomzellen vorkommen. Des Weiteren handelt es sich lediglich um kurze Insertionen oder Deletionen in dem 10-Adenin-Trakt, die monoallelisch oder überwiegend biallelisch determiniert sind. Die HCT116-Zelllinie ist ein Beispiel für eine Kolonkarzinomzelllinie mit einer biallelischen SMAP1-Mutation. Western Blot Analysen und Proteasom-Inhibitor-Versuche mit der HCT116-Zelllinie verifizierten, dass eine SMAP1-Mutation mit einem vollständigen Protein-Funktionsverlust assoziiert ist.

Des Weiteren analysierten *Sanger et al.* die Bedeutung von SMAP1 auf die Onkogenese, indem sie die HCT116-Zelllinie in Kooperation mit der Etablierung von drei SMAP1-komplementierten Klonen untersuchten, bei denen die SMAP1-Expression wiederhergestellt werden konnte. Mit den HCT116 SMAP1-Klonen und der HCT116 Wildtyp (WT)-Zelllinie wurden verschiedene *in-vivo* und *in-vitro* Experimente im Hinblick auf die Zellproliferation durchgeführt. Die Versuche illustrierten allesamt, dass die SMAP1-defiziente HCT116 WT-Zelllinie signifikant schneller proliferierte als die HCT116 SMAP1-Klone. Abschließend erwähnten *Sanger et al.*, dass ihre Ergebnisse mit dem evidentesten Charakteristikum von MSI-Tumoren koinzidieren, denn MSI-Tumore sind insgesamt großwüchsiger als MSS-Neoplasien [94]. Resümierend deuten mehrere Daten auf eine Rolle von SMAP1 als Tumorsuppressor hin [94, 103].

1.4 Das kolorektale Karzinom in der Tiermedizin

In der Kleintiermedizin ist Darmkrebs ebenfalls präsent, dabei gehört das KRK zu den häufigsten gastrointestinalen Tumoren beim Hund. Insgesamt sind beim Hund bis zu 60 % der Tumore im Kolon und Rektum lokalisiert, wo insbesondere Adenokarzinome frequent vorkommen [104].

Katzen erkranken im Vergleich zum Hund seltener an KRK. Während die Inzidenzen von Adenomen bei Rüden und Hündinnen identisch sind, treten Kolonkarzinome zwei- bis dreimal häufiger bei Rüden auf. Das Durchschnittsalter von Hunden der mit Darmkrebs erkrankten Hunde beträgt bei Adenomen 7 Jahre und für Adenokarzinome 8 bis 9 Jahre. Die Symptome des KRK und die diagnostischen Methoden entsprechen denen der Humanmedizin. Des Weiteren ist bei Darmkrebs die operative Resektion des Tumorgewebes auch in der Veterinärmedizin die erste Therapieoption der Wahl. Eine kurative Behandlungsmaßnahme wird erreicht, wenn eine vollständige chirurgische Exzision des Tumors gelingt. Im Gegenzug ist die Prognose des Patienten sehr ungünstig, wenn der Tumor aufgrund lokaler Infiltration und metastatischer Ausbreitung nicht *in toto* entfernt werden kann [105].

Grundsätzlich weisen spontan auftretende Neoplasien von Hunden und anderen Tieren klinische und biologische Übereinstimmungen mit Krebserkrankungen der Menschen auf [106]. Darüber hinaus veranschaulichen mehrere Studien, dass beim sporadischen KRK eine starke genetische Homologie zwischen Menschen und Hunden vorliegt. Es sind genetisch identische Signalwege betroffen, die bei der Tumorentstehung und -progression von KRK eine Rolle spielen [107-109]. In einer weiteren Studie analysierten *Tang et al.* mehrere Darmkrebs-Gewebeproben von Menschen und Hunden im Hinblick auf den Einfluss von Zellpolaritätsproteinen auf die Tumorentstehung. Die Studie zeigt, dass in sporadischen KRKs beider Spezies Polaritätsproteine nicht nur zur Verhinderung der Invasion und Metastasierung von Krebszellen beitragen, sondern wahrscheinlich auch als Tumorsuppressoren dienen, indem sie das Zellwachstum modulieren. Letztlich untermauert diese Studie die Annahme, dass bei verschiedenen Spezies Veränderungen von Polaritätsproteinen und der damit einhergehende Verlust der Zellpolarität zu den Hauptakteuren der KRK-Karzinogenese gehören [110].

Insgesamt ist der Literatur vielfach zu entnehmen, dass insbesondere im Bereich der Onkologie eine starke Assoziation zwischen Mensch und Tier vorliegt [111].

Angesichts dieser Tatsache wurde das *Canine Comparative Oncology and Genomics Consortium* (CCOGC) ins Leben gerufen, um in der Krebsforschung eine Brücke zwischen Human- und Veterinärmedizin zu schaffen, sodass im Hinblick auf neue therapeutische Interventionen hiervon beide Seiten profitieren können [112].

1.5 Ziel dieser Arbeit

Das humane kolorektale Karzinom ist eine prävalente und verlustreiche Krebserkrankung, die trotz umfangreicher Forschungsarbeiten und Therapiefortschritten eine Mortalitätsrate von 40-50 % aufweist [1]. Die Hauptursache für einen krebsassoziierten Tod ist die Migration und Invasion von Krebszellen, die letztlich eine metastatische Dissemination im Organismus ermöglicht [66]. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass wissenschaftliche Untersuchungen in diesem Bereich intensiviert werden müssen, damit spezifische karzinogene Prozesse entschlüsselt und verstanden werden. Infolgedessen können krebsassoziierte Gene bzw. Signalwege identifiziert werden, sodass anknüpfend neue prognostische Marker oder gezielte Krebsmedikamente entwickelt werden können.

Es gibt Hinweise, dass TJ-Komponenten in Zusammenarbeit mit kleinen GTPasen einen entscheidenden Einfluss auf die Onkogenese haben [34, 52]. Pals1 fungiert als ein zentrales Kernpolaritätsprotein der TJ, allerdings ist die Funktion und der Stellenwert von Pals1 in Bezug auf die maligne Tumorprogression noch völlig unklar. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass ein Pals1-Verlust in einer etablierten Kolonkarzinomzelllinie in eine exorbitant verstärkte Zellmigration und Zellinvasion resultiert [113, 114]. In diesem Zusammenhang besteht die Vermutung, dass Pals1 als ein potentieller Tumorsuppressor agiert.

Diese Arbeit baut auf die Ergebnisse der Vorarbeiten auf und konzentriert sich darauf, ein tiefgründiges Verständnis von Pals1 im Hinblick auf die Tumorgenese zu erlangen.

Im Allgemeinen werden in dieser Arbeit zwei Hauptziele verfolgt:

1. Welche Auswirkungen hat ein Pals1-Verlust in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien und kann in diesem Zusammenhang die Hypothese verifiziert werden, dass Pals1 eine essentielle Rolle bei der Suppression von Darmkrebs spielt?
2. Analyse des spezifischen Signalweges und möglicher Kooperationspartner von Pals1 in Bezug auf die Zellmotilität

Für die Realisierung der Ziele wurden weitere Kolonkarzinomzelllinien etabliert, bei denen gleichermaßen ein Pals1-Knockout mithilfe der CRISPR/Cas9-Methode generiert wurde. Des Weiteren sollen GST-Pulldown Assays und Western Blot Analysen dazu beitragen, diskutabile Interaktionspartner von Pals1 zu identifizieren und deren Bedeutung auf die Pals1-induzierte Zellmotilität zu evaluieren.

Die onkologische Thematik, die in dieser Arbeit behandelt wird, kann als Grundlagenforschung deklariert werden und findet dementsprechend auch in der Veterinärmedizin Anwendung. Auf molekularer Ebene ist eine weitläufige Homologie zwischen Menschen und Tieren vor allem in Bezug auf die Onkologie gegeben. Insbesondere das sporadische KRK beim Hund weist die gleichen Entstehungs- und Progressionsmuster wie beim Menschen auf [109, 110].

Neue Erkenntnisse von Pals1 und dessen Relevanz bei der Onkogenese können möglicherweise bei der Entwicklung neuer prognostischer oder therapeutischer Strategien im Kampf gegen den Krebs Anwendung finden.

2 Material

2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Tabelle 1: Geräte und Gebrauchsgegenstände

Bezeichnung	Gerätetyp	Hersteller, Standort
Abzug	Abzug Waldner	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, DE
Autoklav	Systec VX-95	Systec GmbH, Linden, DE
Brutschrank (Bakterien)	Heratherm Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Chemilumineszenz-Detektor	Azure Biosystems c600 Azure Biosystems c150	Azure Biosystems, Dublin, IRL
Eismaschine	Ziegra ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen Isernhagen, DE
Elektrophorese-Apparatur (SDS- PAGE)	Mini-PROTEAN Tetra Cell for Mini precast gels	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Elektrophoresekammer (Agarosegele)	Model B1	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen, DE
Kryogefrierbehälter	Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Magnetrührer	Fisherbrand™ ZX3 Vortex Mixer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikroskop	Observer Z1, Apotome, HXP120, Axiocam MRm	Zeiss AG, Jena, DE
Mikroskop (Zellkultur)	AE31E	Motic GmbH, Wetzlar, DE
Mikrotiterplattenreader	Infinite® M200	Tecan Trading AG, Männerdorf, DE
Mikrowelle	exquisit Mikrowelle MW 2700	GGV Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Kaarst, DE
PCR-Cycler	Biometra TProfessional TRIO Thermocycler	Analytik Jena AG, Jena, DE
pH-Meter	inoLab	WTW, Weilheim, DE
Photometer	Smart Spec™ 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Pipette	Eppendorf Research® plus, 0.1-2.5 µL, 0.5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100- 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettierhilfe	INTEGRA pipetboy	INTEGRA Biosciences Ltd-, Thatcham, UK

Schüttler	Rocker 25	Labnet International, Edison, NJ, USA
	WT 17	Biometra GmbH - Analytik Jena AG, Jena, DE
Schüttelinkubator	Multitron Pro	INFORS GmbH, Einsbach, DE
	Innova® 40	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Sicherheitswerkbänke (Zellkultur)	MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
	Biologische Sicherheitswerkbank SC-BHC-IIA2	Clean Air Technik B.V., Woerden, NL
Stereomikroskop	Leica MZ10 F	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
Stromversorgungsgerät (für Western Blot und Elektrophoresen)	Standard Power Pack P25 Standard Power Pack P25T	Biometra GmbH – Analytik Jena AG, Jena, DE
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Thermoblock	TB1 Thermoblock	Biometra GmbH – Analytik Jena AG, Jena, DE
	VWR® Digital Heatblock	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Tischzentrifuge	Mini Star silverline, Galaxy Mini centrifuge	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Ultraschall-Bad	Sonorex TK30	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus HD 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
UV-Transilluminator	IL-200-M	H-Saur Laborbedarf, Reutlingen, DE
	Bio View UV light	biostep GmbH, Burkhardtsdorf, DE
Vakuumpumpe	Schuett Biotec™ EcoVac Vakuumpumpe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Instruments, Gilching, DE
	REAX top	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Waage	Kompaktwaage Kern 442-43	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Wasserbad	Wasserbad WNE 45	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, DE
Western Blot Apparatur	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE

Zellzähler	LUNA™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq, FRA
Zellkultur-Inkubator	HERACELL 150i CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	Biofuge Primo	Heraceus Instruments, Hanau, DE
	Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.2 Laborbedarf

Tabelle 2: Laborbedarf

Name/ Bezeichnung	Hersteller
1 kb DNA Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
100 kb DNA Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Blotting-Papier	Hahnemühle FineArt GmbH, Dassel, DE
Clarity/ ClarityMax	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Culture-insert 2 well	ibidi GmbH, Gräfelfing, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Handschuhe Abena Classic Latex small/ medium/ large	Abena GmbH, Zörbig, DE
Impfeschlingen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Kanülen 20 G 1 1/2 0,9 x 40 mm Microlance™ 3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Kryoröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
MaiMed® – Tip Wattestäbchen	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, DE
Nitrocellulose-Membran 0,2 µm	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Chicago, USA
Pasteurpipetten	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
PBS, 1x, steril	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Petrischalen für Mikrobiologie	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE

Pipettenspitzen für Photometrie	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Plastik-Einwegküvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße (Safe lock) 0,5-2,0ml	Eppendorf, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Röhrchen für Bakterienkulturen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Skalpelle	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Spritze 1 ml Injekt-F®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Spritzen 25 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Sterilfilter (0,33 µm)	Millipore GmbH, Schwalbach, DE
serologische Pipette, Stripette® 1 ml, 2 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
ThinCert™ Zellkultur Einsätze 24-well TC, steril, Porengröße 8 µm, transluzente Membran aus Pet	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Transferpipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Zellkultur-Platten Cellstar® 6-well, 12-well, 24-well, 48-well, 96-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellschaber, Flexi-Strip	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, DE
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamidlösung 30% (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, DE
Ampicillin	PanReac AppliChem, Darmstadt, DE
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Bromphenolblau	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
cOmplete™ Protease Inhibitor EDTA-free	Roche, Basel, CHE
Crystal Violet	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Cultrex® Basement Membrane Extract (BME)	TREVIGEN®, Helgerman CT, Gaithersburg, USA

Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) Mix, 10 mmol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PanReac AppliChem, Darmstadt, DE
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Gibco™ Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glycerol	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Glycin	PanReac AppliChem, Darmstadt, DE
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Kaliumacetat (CH ₃ COOK)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Metafectene®	Biontex Laboratories GmbH, München/ Laim, DE
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Protino® Glutathione Agarose 4B	Mackerey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE
Puromycin	InvivoGen Europe, Toulouse, FRA
Orange DNA Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Rinderalbumin (Bovine serum albumine, BSA)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Roti® Quant 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE

Tris	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Triton X-100	PanReac AppliChem, Darmstadt, DE
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, DE

2.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
BSA (5%)	2,5g BSA Pulver 50 ml TBST-Puffer
Coomassie-Lösung	0,6 g Coomassie Brilliant Blue 10 ml Eisessig 100 ml H ₂ O
Destaining solutions Waschpuffer MILD: Waschpuffer HART:	50 ml Methanol 880 ml ddH ₂ O 7 % Eisessig 450 ml ddH ₂ O 450 ml Methanol 10 % Eisessig
Genotypisierungspuffer	100 mM Tris pH 8,0 5 mM EDTA 0,2 % SDS 200 mM NaCl auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O
Laemmli-Puffer 2 x Stammlösung Gebrauchslösung 1 x Stammlösung (1:10 Verdünnung) Gebrauchslösung	4 ml 10% SDS 2 ml Glycerol 1,2 ml 1 M Tris-Cl (pH 6,8) 2,8 ml H ₂ O 0,02% Bromphenolblau Zugabe von 60 µl 1 M DTT 1 ml Laemmli-Puffer 9 ml H ₂ O Zugabe von 30µl 1 M DTT
LB-Medium/ Platten LB-Medium LB-Platten	20 g LB-Pulver auf 1 L H ₂ O autoklavieren 10 g LB-Pulver 10 g Agar Mit 500 ml H ₂ O autoklavieren Zugabe von Antibiotika 1:1000

<p>Mini-/ Midipräparations-Puffer P1 Stammlösung</p> <p>P1 Gebrauchslösung</p> <p>P2 Stammlösung/ Gebrauchslösung</p> <p>P3 Stammlösung/ Gebrauchslösung</p>	<p>3,94 g Tris-HCl (pH 8,0) 1,46 g EDTA auffüllen auf 450 ml mit H₂O Lagerung bei 4 °C</p> <p>90 ml P1 Stocklösung 10 ml RNase A 90 U/ mg (verdünnt 100µg/ml)</p> <p>200 mM NaOH 1% SDS auffüllen auf 250 ml mit H₂O</p> <p>3 M Kaliumacetat auffüllen auf 500 ml mit H₂O pH Wert von 5,5 einstellen Lagerung bei 4 °C</p>
<p>PBS-Puffer 10 x Stammlösung</p> <p>Gebrauchslösung (1:10 Verdünnung)</p>	<p>80 g NaCl 2 g KCl 2 g KH₂PO₄ 7,62 g Na₂HPO₄ auffüllen auf 1 Liter mit H₂O</p> <p>100 ml PBS 10 x Stock 900 ml PBS H₂O pH-Wert von 7,4 einstellen</p>
<p>SDS-Elektrophorese-Puffer 10 x Stammlösung</p> <p>Gebrauchslösung (1:10 Verdünnung)</p>	<p>30,3 g Tris 187,7 g Glycine 50 ml 20% SDS auffüllen auf 1 Liter mit H₂O</p> <p>100 ml SDS-Elektrophorese-Puffer 10 x 900 ml H₂O</p>
<p>TBST-Puffer 10 x Stammlösung</p> <p>Gebrauchslösung (1:10 Verdünnung)</p>	<p>12,1 g Tris 87,7 g NaCl 5 ml Tween 20 auffüllen auf 1 Liter mit H₂O pH-Wert von 8,0 einstellen</p> <p>100 ml TBST-Puffer 10 x 900 ml H₂O</p>
<p>TNT-Puffer</p>	<p>150 mM NaCl 50 mM Tris 1 % Triton pH-Wert von 7,4 einstellen auffüllen auf 400 Milliliter mit H₂O Lagerung bei 4 °C</p>

Transfer-Puffer 10 x Stammlösung	144,2 g Glycin 30,4 g Tris auffüllen auf 1 Liter mit H ₂ O
Gebrauchslösung (1:10 Verdünnung)	100 ml Transferpuffer 10 x Stock 100 ml Ethanol 70% 800 ml H ₂ O

2.5 Enzyme

Tabelle 5: Enzyme

Enzyme	Hersteller
ACCUZYME™ DNA Polymerase 2.5 U/μL und AccuBuffer (10 x)	Meridian Bioscience, Inc., Memphis, USA
Proteinase K > 600 U/ml	biotechrabbit GmbH, Hennigsdorf, DE
RNase A 90 U/ mg	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Trypsin-EDTA (10 x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE

2.6 Kommerzielle Kits

Tabelle 6: Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena AG, Jena, DE
NucleoBond® PC 20	Mackerey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE

2.7 Plasmid

Tabelle 7: Plasmid

Plasmidname	Hersteller
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0	Addgene Europe, Teddington, UK (Plasmid #62988)

2.8 CRISPR/Cas9 Konstrukte

Tabelle 8: CRISPR/Cas9 Konstrukte

Name	Gen	Sequence (5'-3') der sgRNA	Referenz
hMPP5-CRISPR1	MPP5 (Pals1)	GCCCTGGAGATTTGGGCACC	AG Krahn, Münster
hSMAP1-CRISPR1	SMAP1	GTATCTGTTCTGCTGTCCAT	AG Krahn, Münster
hSMAP1-CRISPR2	SMAP1	GTTATCTGTTTTTCAGAGCAG	AG Krahn, Münster

2.9 Vektoren für GST-Pulldown-Assay

Tabelle 9: Vektoren für GST-Pulldown-Assay

Spender	Vektor	Nukleinsäure	GVO	Referenz
Klonierte humane cDNA isoliert aus E.coli	pGEX-2T	GTPase-Bindedomäne von humanem PAK1 (aa 67-150) (NM_001128620.1)	E.coli: pGEX-GST-PAK1-PBD	Addgene Europe, Teddington, UK
Klonierte humane cDNA isoliert aus E.coli	pGST1	AG Krahn, Münster Humanes ARF binding (GGA3) protein Gene ID: 23163	E.coli: pGST1_GGA3-VHS	Addgene Europe, Teddington, UK

2.10 Sequenzierungsprimer

Tabelle 10: Sequenzierungsprimer

Name	Gen	Sequence (5'-3')
hMPP5 CR1 fw	MPP5 (Pals1)	TTTTTAGGGTGCTACAGTTCGT
hMPP5 CR1 rv	MPP5 (Pals1)	TTCTAGCTGCGTCAACTTACCA
hSMAP1 CR1 fw	SMAP1	CTAAATTAGGTCCTCGATGGGC
hSMAP1 CR1 rv	SMAP1	CCAATTTTATACGTGGCATATGCC
hSMAP1 CR2 fw	SMAP1	CAGCTTTGTGGAGTGGCG
hSMAP1 CR2 rv	SMAP1	GGTTTTACTTACATTTGTAATAGCTATGCC

2.11 Antikörper

2.11.1 Primäre Antikörper

Tabelle 11: Primäre Antikörper

Zielprotein	Spezies	Hersteller	Verdünnung
α -Actinin 4 (D7U5A)	Kaninchen	Cell Signaling Technology (#6487)	1:1000
Arf6	Maus	Santa Cruz (#7971)	1:500
β -Actin	Maus	Santa Cruz (#47778)	1:1000
Pals1	Kaninchen	Proteintech (17710-1AP)	1:2000
Pals1	Maus	Santa Cruz (#365411)	1:1000
Rac	Maus	Santa Cruz (#514583)	1:500
SMAP1	Maus	Abnova (H00060682-B01P)	1:1000

2.11.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 12: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Herstellungsmodell	Hersteller	Verdünnung
HRP-konjugiertes anti-Maus IgG	Ziege	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark	1:2000
HRP-konjugiertes anti-Kaninchen IgG	Ziege	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark	1:2000

2.12 Bakterienstämme

Tabelle 13: Bakterienstämme

Spezies	Genotyp	Hersteller
E. coli DH10B	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK λ - rpsL(StrR) nupG	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
E. coli Rosetta™	F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm pRARE2 (CamR)	Merck KGaA, Darmstadt, DE

2.13 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 14: Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturbedingungen	Referenz
DLD1 WT	Epitheliale kolorektale Adenokarzinomzelllinie (human)	37 °C, 5 % CO ₂	AG Krahn, Münster
DLD1 ΔPals1	Epitheliale kolorektale Adenokarzinomzelllinie (human) <i>Knockout für Pals1</i>	37 °C, 5 % CO ₂	AG Krahn, Münster
DLD1 ΔSMAP1	Epitheliale kolorektale Adenokarzinomzelllinie (human) <i>Knockout für SMAP1</i>	37 °C, 5 % CO ₂	AG Krahn, Münster
DLD1 ΔPals1-SMAP1	Epitheliale kolorektale Adenokarzinomzelllinie (human) <i>Knockout für Pals1 und SMAP1</i>	37 °C, 5 % CO ₂	AG Krahn, Münster
Caco-2 WT	Epitheliale kolorektale Adenokarzinomzelllinie (human)	37 °C, 5 % CO ₂	AG Krahn, Münster
Caco-2 ΔPals1	Epitheliale kolorektale Adenokarzinomzelllinie (human) <i>Knockout für Pals1</i>	37 °C, 5 % CO ₂	AG Krahn, Münster
RKO WT	Epitheliale kolorektale Karzinomzelllinie (human)	37 °C, 5 % CO ₂	AG Krahn, Münster
RKO ΔPals1	Epitheliale kolorektale Karzinomzelllinie (human) <i>Knockout für Pals1</i>	37 °C, 5 % CO ₂	AG Krahn, Münster
SW48 WT	Epitheliale kolorektale Adenokarzinomzelllinie (human)	37 °C, 5 % CO ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
SW48 ΔPals1	Epitheliale kolorektale Adenokarzinomzelllinie (human) <i>Knockout für Pals1</i>	37 °C, 5 % CO ₂	AG Krahn, Münster
LoVo WT	Epitheliale kolorektale Adenokarzinomzelllinie (human)	37 °C, 5 % CO ₂	Onkologie, Münster
LoVo ΔPals1	Epitheliale kolorektale Adenokarzinomzelllinie (human) <i>Knockout für Pals1</i>	37 °C, 5 % CO ₂	Onkologie, Münster

2.14 Kommerzielle Zellkulturmedien

Tabelle 15: Kommerzielle Zellkulturmedien

Medium	Zellen	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Low glucose (1 g/L)	Caco-2, RKO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
RPMI-1640 Medium	DLD1, SW48, LoVo inklusive der Knockout-Zellen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE

2.15 Software, Datenbanken, Suchmaschinen

Tabelle 16: Software, Datenbanken, Suchmaschinen

Programmname	Hersteller	Verwendung
Axiovision 4.8	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH© 2006-2009	Mikroskop-Aufnahmen und Bearbeitung von Bildern
BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)	NCBI (National Center for Biotechnology Information)	Sequenz-Alignment
CorelDRAW Graphics Suite X6	Corel Corporation© 2012	Erstellen von Grafiken
Endnote	Thomson Reuters Corporation, NY, USA	Zitierprogramm
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc.	Erstellen von Diagrammen Statistische Auswertung
i-Control Software	byTecan Austria GmbH, Grödig/ Salzburg, AUT	Microplatten-Analyse unter Verwendung des Tecan Infinite M200
ImageJ	Wayne Rasband (NIH)	Auswertung der Western Blots Auswertung des Migrationsassays
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation© 2010, Redmond, USA	Word, Excel, PowerPoint
PubMed (<i>U.S. National Library of Medicine/ National Institutes of Health</i>)	NCBI, Bethesda MD, USA	Datenbank
SnapGene	GSL Biotech LLC	Analyse der CRISPR-Sequenzen

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien

Für diese Arbeit wurden unterschiedliche Kolonkarzinomzelllinien verwendet. Die Kultivierungsbedingungen der Zelllinien sind in Tabelle 14 aufgeführt. Alle Zellkulturarbeiten wurden mit einer mikrobiologischen S1-Sicherheitsbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Erhaltung wurden die Zellen in einer 10 cm Petrischale in ihrem Medium bei 37 °C und 5 %igem CO₂-Anteil in einem Wärmeschrank kultiviert. Die Zellen wurden passagiert, sobald sie eine Konfluenz von 80-100 % erreicht hatten oder für einen Versuch benötigt wurden. Für das Passagieren wurde das alte Kulturmedium durch eine Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen wurden einmalig mit PBS gewaschen, damit das alte Kulturmedium vollständig entfernt werden konnte. Anschließend wurde zum Ablösen der Zellen 1 ml Trypsin-Lösung hinzugegeben und die Zellen wurden für 5-10 min im Wärmeschrank inkubiert. Für die SW48- und LoVo-Zelllinien wurde das Trypsin zuvor im Verhältnis von 1:5 mit Medium verdünnt, damit die empfindlichen Zellen nicht zu stark geschädigt wurden. Bei den anderen Zelllinien wurde das Trypsin unverdünnt verwendet.

Das Trypsin spaltet die Adhärenzproteine, mit denen sich die Zellen als Monolayerkulturen an den Boden der Kulturschale anhaften. Nach der Inkubationszeit wurde das Ablösen der Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und gegebenenfalls durch leichtes Klopfen unterstützt. Danach wurden 9 ml neues Kulturmedium zu den mit Trypsin abgelösten Zellen hinzugefügt und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Stripette wurde die Zellsuspension homogenisiert. Die Zugabe des mit 10 % FCS versetzten Kulturmediums stoppt die Wirkung des Trypsins. Von der Zellsuspension wurde, in Abhängigkeit von der gewünschten Zielkonfluenz, ein gewisser Anteil zur Weiterkultivierung auf eine neue 10 cm Petrischale überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein Gesamtvolumen von 10 ml in einer Zellkulturschale erreicht werden konnte.

3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung erlaubt es, Zellen dauerhaft aufzubewahren, um somit über einen gewissen Zellbestand zu verfügen. Dafür wurden Zellen verwendet, die eine Konfluenz von 80-100 % in einer 10 cm Petrischale erreicht hatten. Die Zellen wurden mit Trypsin gelöst (s. Abs. 4.1.1) und anschließend wurde die homogenisierte Zellsuspension in einem 15 ml Falcon für 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 300 g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wird ein Zellpellet erzeugt, das es ermöglicht, den Überstand vorsichtig abzusaugen zu können, ohne Zellen zu verlieren. Das Zellsediment wurde mit 3 ml frischem Medium und Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem Verhältnis von 1:10 resuspendiert. DMSO verhindert die intrazelluläre Eiskristallbildung, wodurch eine Zellschädigung vermieden wird.

Die Zellsuspension wurde als 1 ml Aliquot auf 3 Kryo-Röhrchen aufgeteilt. Danach wurden die Kryo-Röhrchen in einen Kryogefrierbehälter im - 80 °C Gefrierschrank für zwei Tage gelagert, bevor sie für eine längerfristige Aufbewahrung in den Stickstofftank verwahrt wurden.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Damit eine eingefrorene Zelllinie wieder in Kultur genommen werden konnte, wurde das entsprechende Kryo-Röhrchen zügig aus dem Stickstofftank geholt und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 9 ml Medium in ein 15 ml Falcon überführt und 5 min bei RT und 300 g herunterzentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in eine 10 cm Petrischale mit 9 ml frischem Medium ausgesät. Durch die Zentrifugation und den Mediumwechsel konnte davon ausgegangen werden, dass die Zellen weitestgehend von dem toxischen DMSO befreit wurden.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde das LUNA™ *Automated Cell Counter* Zellzahlgerät verwendet. Dazu wurden die Zellen, wie in 4.1.1 beschrieben, mit Trypsin behandelt und mit frischem Medium homogenisiert. Danach wurden 10 µl der Zellsuspension in einem 1:1 Verhältnis mit Trypanblau in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach mehrmaliger Resuspendierung wurden anschließend 10 µl von der Lösung in die Zellkassette überführt und in das Zellzählgerät hineingeschoben. Das

Gerät berechnet die gesamte Zellzahl, sowie den lebenden und toten Zellanteil, bezogen auf einen Milliliter.

3.1.5 Herstellung von Zelllysaten

Damit das proteinbiochemische Verhalten der verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien analysiert werden konnte, mussten die Zellen zunächst lysiert werden.

Je nach Versuch wurden die Zellen zuvor auf eine 10 cm Petrischale oder einer Mikrotiterplatte (6-well-Platte, 24-well-Platte) ausgesät und bis zur Zielkonfluenz von 100 % bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.1.5.1 Herstellung von Zelllysaten mit TNT-Puffer und Protease-Inhibitor

Die Art der Zelllysate-Herstellung mithilfe von TNT-Puffer und Protease-Inhibitor wurde verwendet, um die Proteinkonzentration mittels Bradford-Messung zu validieren (s. Abs. 4.4.1) und die parallelisierenden Zelllysate durch eine entsprechende Verdünnung auf ein gleiches Proteinlevel zu bringen.

Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, auf Eis gestellt und es wurde 400 µl TNT-Puffer + Protease-Inhibitor bei einer 10 cm Petrischale hinzugefügt. Die Menge an Puffer variierte in Abhängigkeit von der Größe der Zellkulturschale. Mithilfe eines Zellschabers wurde der Zellrasen abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Zum Zellaufschluss wurden die Zellen für 7 min in einem Ultraschallbad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 12.000 rpm. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, es wurde eine Bradford-Messung (s. Abs. 4.1.1) durchgeführt und die Proben im Anschluss angleichend mit H₂O verdünnt. Danach erfolgte die Zugabe von 2xLaemmli-Puffer im Verhältnis von 1:1, welches zuvor mit DTT (Dithiothreitol) versetzt wurde (60 µl DTT pro 1 ml 2xLaemmli-Puffer). Zum Schluss wurden die Proben für 5 min bei 95 °C aufgekocht und entweder bei - 80 °C gelagert oder direkt für eine Western Blot Analyse verwendet.

3.1.5.2 Herstellung von Zelllysaten mit 1xLaemmli-Puffer

Für die Erzeugung von Zelllysaten, bei denen das exakte Proteinlevel irrelevant war bzw. nicht angeglichen werden musste, wurde ausschließlich ein 1xLaemmli-Puffer genutzt. Vor der Nutzung wurde der 1xLaemmli-Puffer mit DTT transponiert (30 µl DTT pro 1 ml 1xLaemmli-Puffer). Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, der 1xLaemmli-Puffer wurde hinzugegeben und das Zelllysate in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß

überführt. Für eine 6-well-Platte wurde 1 ml 1xLaemmli-Puffer verwendet, jedoch divergierte die Menge in Bezug auf die Größe der Zellkulturschale. Daraufhin wurden die Proben ebenfalls für 5 min bei 95 °C aufgekocht und zum besseren Zellaufschluss mehrmals durch eine Spritze mit einer Kanüle von 0,9 mm Durchmesser gezogen. Die Lagerung erfolgte wie bereits beschrieben (siehe 4.1.5.1).

3.1.6 Migrationsassay

Unter Verwendung des Migrationsassays konnten die verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien im Hinblick auf ihr migratorisches Verhalten, welches mit der Malignität der Zellen einhergeht, untersucht werden.

Für den Assay wurden spezielle 2 well culture-inserts eingesetzt. Die *culture-inserts* bestehen aus einem Silikonmaterial, besitzen zwei *wells* und eine klebende Unterseite. Mithilfe einer Pinzette wurden die *culture-inserts* in eine 6-well-Platte mit sanftem Druck festgeklebt, sodass ein Auslaufen während der Kultivierung verhindert wurde. Die Trennwand zwischen den zwei *wells* erzeugt nach Entfernung der *culture-inserts* einen definierten Migrationsspalt von 500 µm. Die Lokomotion der Zellen in diesen Spalt hinein wird in Echtzeit durch ein Mikroskop gemessen, sodass daran die Migrationsgeschwindigkeit validiert werden kann.

Die Basis für den Versuch stellte eine 70-100 % konfluente, mit Zellen bewachsene 10 cm Petrischale dar. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst und nach zehnminütiger Inkubation mit neuem Medium homogenisiert und in ein 15 ml Falcon überführt. Daraufhin wurden die Zellen 5 min bei RT und 150 g zentrifugiert und anschließend in 4 ml Medium resuspendiert. Die Zellen waren nun weitestgehend vereinzelt, sodass sie durch das Zellzählgerät gezählt werden konnten (s. Abs. 4.1.4). In Abhängigkeit von der jeweiligen Kolonkarzinomzelllinie wurde eine bestimmte Zellzahl für jedes *well* der *culture-inserts* benötigt (s. Tab. 17). Die Zielkonzentration wurde in die einzelnen *wells* der *culture-inserts* pipettiert und im Anschluss wurden die Zellen für ungefähr 24 h inkubiert. Damit der eigentliche Migrationsversuch gestartet werden konnte, mussten die Zellen eine Konfluenz von 100 % aufweisen und es durften keine Zellen bereits in dem Spalt migriert sein. Wurden diese Voraussetzungen erfüllt, konnte das *culture-inserts* vorsichtig entfernt und 1,5 ml Medium hinzugegeben werden. Direkt im Anschluss wurden Aufnahmen des Zellmonolayers unter Verwendung des Mikroskops angefertigt, wobei der Zellspalt im Fokus stand. Es wurden insgesamt drei Bilder aufgenommen: ein Bild im oberen Drittel, ein Bild in der

Mitte und ein Bild im unteren Drittel. Daraufhin wurden die unterschiedlichen Zelllinien für eine bestimmte Stundenzahl, unter Rücksichtnahme ihrer entsprechenden Migrationsfähigkeit, inkubiert. Im Anschluss wurden erneut drei Bilder von den identischen Stellen aufgenommen (s. Tab. 17). Für die Auswertung der Migrationsaufnahmen wurde die Computersoftware ImageJ verwendet.

Tabelle 17: Angabe der Zellzahl und der Inkubationszeit für den Migrationsassay bei den verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zellzahl	Inkubation (Stunden)
DLD1 WT DLD1 Δ Pals1 DLD1 Δ SMAP1 DLD1 Δ Pals1-SMAP1	50.000 Zellen pro Well	13,5
Caco2 WT Caco2 Δ Pals1	80.000 Zellen pro Well	24
SW48 WT SW48 Δ Pals1	150.000 Zellen pro Well	72
LoVo WT LoVo Δ Pals1	150.000 Zellen pro Well	24

3.1.7 Invasionsassay

Neben der Zellmigration ist die Zellinvasion ein mehrstufiger Prozess, der eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Tumorgenität von Krebszellen spielt. Bei der Invasion brechen Krebszellen in umliegendes Gewebe ein, wodurch betroffenes Gewebe nicht nur zerstört, sondern zudem auch die Metastasierung ermöglicht wird. Bei dem Invasionsassay wird dieser Mechanismus durch die Verwendung von speziellen ThinCert™ Zellkultureinsätzen nachgeahmt. Der Boden der Zellkultureinsätze besteht aus einer transluzenten Membran mit einem Porendurchmesser von 8 μ m. Für den Versuch wurden die Zellkultureinsätze in eine 24-well-Platte eingesetzt und anschließend mit einem Basalmembranextrakt (BME) beschichtet. Das BME liegt zunächst als eine flüssige Lösung vor, welche bei 37 °C zu einer Basalmembran polymerisiert. In Abbildung 5 kann der detaillierte Versuchsaufbau betrachtet werden. Ziel ist es, unter Verwendung eines

chemoattraktiven Gradienten, den Zellen einen Anreiz zu geben, die Basalmembran mittels Proteolyse abzubauen und aktiv durch diese und die anschließende Porenmembran durchzudringen. Als *Chemoattractant* wird ein mit FCS-versetztes Medium verwendet, da das Serum viele Wachstumsfaktoren und Zytokine enthält, welche die Tumorzellen anlocken sollen. Durch den Invasionsassay kann die chemotaktische und invasive Kapazität der Kolonkarzinomzelllinien evaluiert und quantifiziert werden.

Zu Beginn des Experiments wurde das BME bei 4 °C im Kühlschrank auf Eis über Nacht behutsam aufgetaut und im Anschluss mit serumfreiem Medium auf 2 mg/ml verdünnt. Daraufhin wurde eine 24-well-Platte mit den entsprechenden Zellkultureinsätzen, die zuvor im Kühlschrank gekühlt wurden, bestückt und außerdem wurden diese mit 100 µl der BME-Lösung luftblasenfrei beschichtet. Anschließend wurde die 24-well-Platte für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Wärmeschrank inkubiert, damit die Basalmembran polymerisieren konnte.

Für die Durchführung des Assays wurde eine 10 cm Petrischale mit einer Zellkonfluenz von 70-100 % benötigt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert, mit serumfreiem Medium homogenisiert und in ein 15 ml Falcon pipettiert. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei RT und 150 g. Danach wurde der Mediumüberstand abgesaugt und die Zellen erneut mit serumfreiem Medium resuspendiert. Durch die Waschschrte mit serumfreiem Medium sollte erreicht werden, dass die Zellen vollständig von dem FCS befreit wurden, welches sich in dem vorherigen Kulturmedium befand. Anschließend wurden die Zellen erneut herunterzentrifugiert und mit 3 ml serumfreiem Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen gezählt (s. Abs. 1.1.4) und auf 5×10^5 Zellen/ml in 1 ml Endvolumen verdünnt. Nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit wurden 200 µl der verdünnten Zellsuspension in den Zellkultureinsatz ausgesät. Des Weiteren wurde 1,5 ml mit FCS-versetztes Medium in die jeweiligen wells pipettiert, sodass dadurch der chemoattraktive Gradient erzeugt wurde. Nachdem sich die Zellen durch die Basalmembran und die Porenmembran bewegt hatten, adhärirten sie an der Membranunterseite der Zellkultureinsätze.

Die 24-well-Platte wurde für eine bestimmte Zeit inkubiert (s. Tab. 18), um anschließend die adhärirten Zellen mittels Kristallviolett anzufärben. Dazu wurden die Zellkultureinsätze mit einer Pinzette gefasst und die Basalmembran mithilfe von Wattestäbchen entfernt. Danach wurden die Einsätze für 10 min mit Paraformaldehyd

(PFA) inkubiert, sodass alle durchgewanderten Zellen fixiert werden konnten, um sie im Anschluss für 20 min mit Kristallviolett (0,05 %) anzufärben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellkultureinsätze kurz in destilliertes Wasser eingetaucht, um sie dann zum Trocknen in einer dunklen Umgebung zu lagern. Nachdem die Zellkultureinsätze ausreichend getrocknet waren, wurden unter Verwendung des Mikroskops Aufnahmen angefertigt.

Für die Auswertung wurden die Zellkultureinsätze mit 750 µl Methanol in einer 24-well-Platte für 10 min inkubiert. Durch das Methanol löste sich das Kristallviolett, sodass der Farbstoffanteil anhand der Wellenlänge mithilfe des *Mikrotiterplattenreaders* gemessen werden konnte. Dazu wurden 100 µl des gelösten Farbstoffs in eine 96-well-Platte pipettiert, der dann photometrisch gemessen wurde (optische Dichte, OD570).

Tabelle 18: Angabe der Inkubationszeit und prozentualer Anteil des FCS bei den verwendeten Zelllinien für den Invasionsassay

Zelllinie	Inkubation (Stunden)	Anteil FCS
DLD1 WT DLD1 ΔPals1 DLD1 ΔSMAP1 DLD1 ΔPals1-SMAP1	55	10% FCS
Caco2 WT Caco2 ΔPals1	96	20% FCS
SW48 WT SW48 ΔPals1	120	20% FCS
LoVo WT LoVo ΔPals1	72	10% FCS

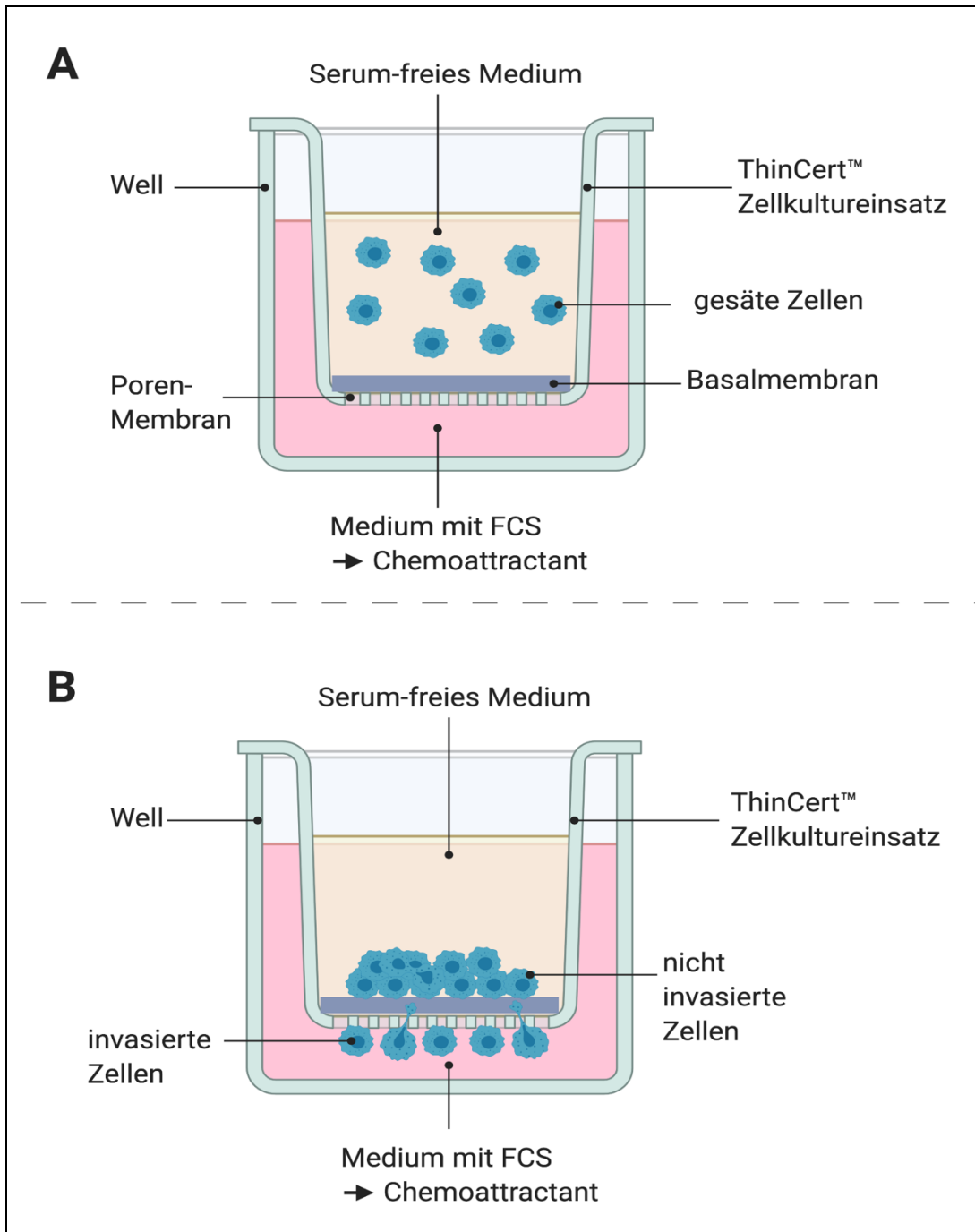


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Invasionsassays

Die Illustrationen A und B zeigen den *ThinCert™* Zellkultureinsatz, welcher über eine Porenmembran verfügt und mit einer speziellen Basalmembran beschichtet ist. In dem Zellkultureinsatz befindet sich Serum-freies Medium, während sich in dem tiefer liegenden well ein Medium befindet, dass mit FCS substituiert ist. Die Illustration A veranschaulicht die frisch ausgesäten Zellen zum Zeitpunkt 0. Demgegenüber präsentiert die Illustration B das Szenario nach einer gewissen Inkubationszeit, nachdem bereits einige Zellen durch die Basalmembran und der anschließenden Porenmembran invasiert sind, um an der letzteren zu adhären.

3.2 Das CRISPR/Cas9 System zur Etablierung von Knockout-Zelllinien

3.2.1 Einführung in das CRISPR/Cas9-System

Die CRISPR/Cas9-Methode stellt ein revolutionäres Verfahren in der Gentechnik dar, bei der gezielte Gene punktgenau editiert, manipuliert und ausgeschaltet werden können. Prokaryoten stellen den Ursprung des Systems dar, wobei feindliche Viren als eine Art Gedächtnis abgespeichert werden, um diese nachfolgend erfolgreich abwehren zu können [115, 116].

Dieses System beruht auf drei grundlegende Bausteine: die *CRISPR*-RNA (crRNA), die *trans-activating crRNA* (tracrRNA) und die Nuklease Cas9 (*CRISPR associated protein 9*) [117]. Im Anschluss einer Virusinfektion wird die Fremd-DNA in das bakterielle oder archäologische Genom in die sogenannte *CRISPR*-Region (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) integriert [118].

Bei einem erneuten Virusangriff wird die genetische Information der *CRISPR*-Region in eine crRNA übersetzt. Die crRNA verbindet sich mit der tracrRNA und das crRNA/tracrRNA-Molekül aktiviert die Nuklease Cas9. Die crRNA bindet sich komplementär an die Zielsequenz des Virus und infolgedessen zerschneidet das gekoppelte Enzym Cas9 die DNA, um den Angreifer gefahrlos zu machen (s. Abb. 6) [119]. Der Schneidprozess für die Cas9-Nuklease basiert zudem auf dem Vorhandensein einer PAM-Sequenz (*protospacer adjacent motif*). Die PAM-Sequenz besteht bei der Cas9-Nuklease aus einer NGG-Konsensussequenz (zwei Guanin-Basen und eine beliebige Base) und tritt ein Basenpaar hinter der crRNA-Bindungssequenz innerhalb der Ziel-DNA auf. Der DNA-Strang wird durch die Cas9-Nuklease *upstream* der PAM gespalten [120]. Dabei wird ein Doppelstrangbruch erzeugt, der entweder durch ein nicht-homologes *end-joining* (NHEJ) oder durch eine homologe Rekombination (HDR) schnell repariert wird. Das NHEJ führt häufig zu kurzen oder großen Deletionen, Insertionen und Punktmutationen, wohingegen die HDR spezifische Sequenzen in die Schneidstelle inkludiert [121, 122].

Das CRISPR/Cas9-System ist nicht nur grundsätzlich auf jeden Organismus anwendbar, sondern kann auch individuell auf jedes beliebige Gen angepasst werden [123]. Mithilfe dieser Genschere kann eine Mutagenese künstlich induziert werden,

wodurch die Relevanz und Tragweite einzelner Gene genauestens erforscht werden können [119].

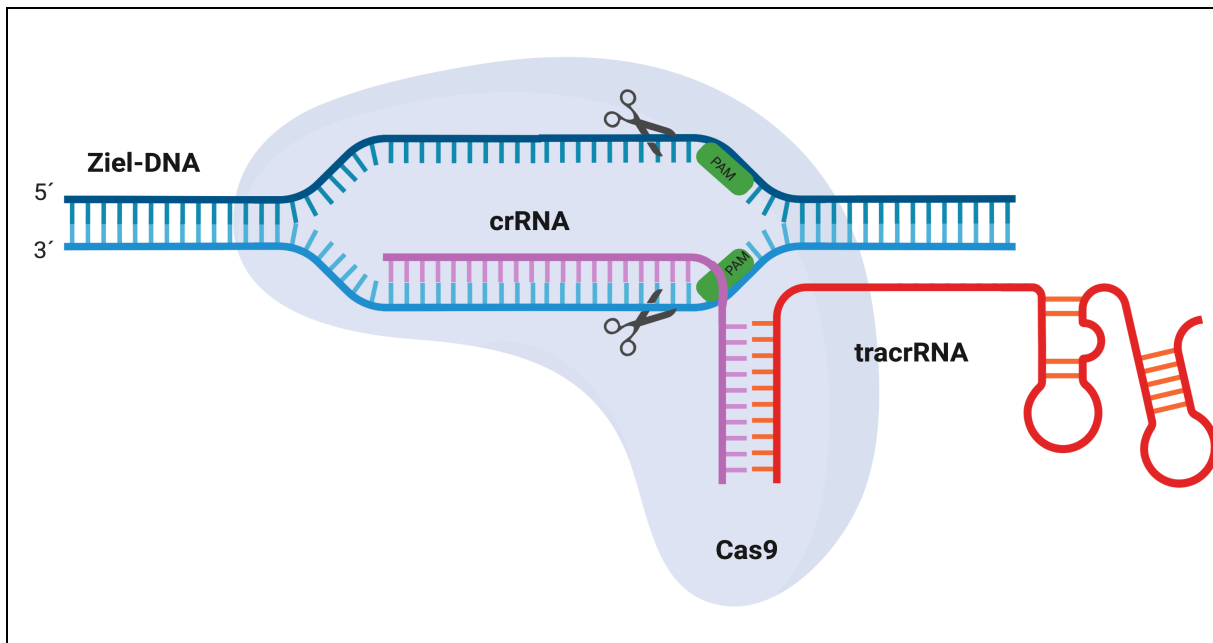


Abbildung 6 Das CRISPR/Cas9 System

Das CRISPR/Cas9 System besteht aus drei wesentlichen Komponenten: der crRNA, die komplementär an die Zielsequenz bindet; der tracrRNA, die für die Stabilisierung zwischen crRNA und Cas9 verantwortlich ist und der Nuklease Cas9, welche die DNA zerschneidet. Dieser Riboproteinkomplex identifiziert pathogene DNA in Verbindung mit der spezifischen PAM-Sequenz und generiert einen DNA-Doppelstrangbruch, wodurch der Angreifer exterminiert wird [124, 125].

3.2.2 Guide RNA Design (sgRNA sequences)

In der Gentechnik kann durch ein gezieltes Design eine sgRNA (*single-guide* RNA) generiert werden. Die sgRNA ersetzt die im Bakterium separat vorzufindenden crRNA und tracrRNA. Es wurde für den sgRNA-Design der Vektor PX459 ausgewählt. Dieser Vektor enthält einen U6-Promotor, einen sgRNA-spacer, die Nuklease Cas9, eine Puromycin-Resistenz und eine Ampicillin-Resistenz. Die Konstruierung der sgRNA und die Klonierung der Sequenz in den Vektor wurde für das Pals1-CRISPR-Konstrukt von Anne Katrin Weber und für das SMAP1-CRISPR1-Konstrukt bzw. SMAP1-CRISPR2-Konstrukt von Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. rer. nat. Michael Krahn durchgeführt. E.coli-DH10B-Bakterien wurden zur Vervielfältigung mit dem jeweiligen klonierten Plasmid-Konstrukt transformiert. Anschließend konnte die Plasmid-DNA

unter Verwendung einer Mini-Präparation isoliert und aufgereinigt werden (s. Abs. 4.3.1, 4.3.2).

3.2.3 Transfektion des CRISPR/Cas9-Plasmids

Als Vorbereitung wurde die zu transfizierende Zelllinie in eine 6-*well*-Platte mit einer Zielkonfluenz von 50-70 % ausgesät. Pro *well* wurden 100 µl Opti-MEM, einmal mit 2 µg des CRISPR-Plasmids und einmal mit 6 µl Transfektionsmedium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transponiert. Danach wurden beide Lösungen vereinigt, gevortext und für 20 min bei RT inkubiert. Als Transfektionsmedium wurde für die DLD1 WT- und DLD1 Δ Pals1-Zelllinie Metafectene® ausgewählt und für die schwerer zu transfizierenden SW48- und LoVo-Kolonkarzinomzelllinien wurde LipofectamineTM verwendet. Im Anschluss wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zielzellen mit frischem Medium gegeben. Um die Transfektionseffizienz sichtbar zu kontrollieren, wurde gleichzeitig eine GFP-Kontroll-*well* angesetzt (GFP steht für grün fluoreszierendes Protein). Dafür wurde anstatt des CRISPR-Plasmids ein Plasmid verwendet, das eine GFP-Sequenz enthielt, sodass alle transfizierten Zellen fluoreszierten. Die Zellen wurden für 24 h im Wärmeschrank inkubiert, um dann mit der Puromycin-Selektion fortzufahren.

3.2.4 Selektion, Isolierung und Identifizierung der Knockout-Zellen

Alle CRISPR-Plasmide enthielten ein Puromycinresistenzgen, wodurch unter Verwendung der Puromycin-Selektion alle Zellen eliminiert werden konnten, die nicht erfolgreich transfiziert wurden. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 300 µl Trypsin gelöst, in frischem Medium resuspendiert und dann auf eine 10 cm Petrischale ausgesät (s. Abs. 4.1.1). Für die Selektion wurde das Kulturmedium mit 5 µl Puromycin versetzt. Zusätzlich wurde eine Puromycin-Kontroll-Platte ohne Transfektionansatz angelegt, um sicherzugehen, dass alle nicht behandelten Zellen absterben. Die Selektion wurde nach zwei Tagen durch einen Mediumwechsel gestoppt. Dann schloss sich eine Regenerationsphase der überlebenden Zellen für sieben bis zehn Tage an, während fast täglich ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Nachdem vereinzelte Zellen zu einer Kolonie herangewachsen waren, wurden sie gepickt und in eine 48-*well*-Platte überführt. Sobald die 48-*well*-Platte konfluent genug bewachsen war, wurden die Zellen auf zwei 24-*well*-Platten ausgesät. Dabei wurde eine

24-*well*-Patte für die Weiterkultivierung der Zellen genutzt, während die andere 24-*well*-Platte zur Erzeugung von Zelllysaten genutzt wurde (s. Abs. 4.1.5.2).

Der Nachweis der Knockout-Zellen durch die CRISPR/Cas9-Methode wurde sowohl auf proteinbiochemischer Ebene mittels Western Blot (siehe 4.4.3), als auch auf DNA-Ebene durch eine Sequenzierung (siehe 4.2.9) realisiert. Dabei ermöglichte die Western Blot Analyse es, einen ersten Eindruck über die Effizienz der CRISPR sgRNA und die Anzahl der positiven Knockout-Zellklone zu bekommen. Positive Zellklone wurden weiter kultiviert, schnellstmöglich kryokonserviert und dann anschließend sequenziert. Die Sequenzierung wurde zusätzlich genutzt, um die genaue Mutation zu lokalisieren bzw. zu charakterisieren und außerdem, um heterozygote Zellklone auszuschließen.

3.2.5 Gewinnung genomischer DNA

Für die Sequenzierung musste als erster Schritt die genomische DNA gewonnen werden. Dazu wurden die Zellen in eine 6-*well*-Platte mit einer Zielkonfluenz von 80-100 % kultiviert. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, auf Eis gestellt und es wurden 200 µl Genotypisierungspuffer mit 2 %iger Proteinase K > 600 U/ml (1:100 verdünnt) pro *well* auf die Zellen gegeben. Das Zelllysate wurde abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 5 h bei 56 °C und 400 rpm inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Erhitzung für 5 min bei 95 °C, um die Proteinase K zu inaktivieren. Danach erfolgte eine Zentrifugation von 15 min bei 14.000 g, wobei der Überstand anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Die genomische DNA wurde entweder direkt für die Genotypisierungs-PCR verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

3.2.6 Genotypisierungs-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde genutzt, um eine gezielte Vervielfältigung bestimmter DNA-Bereiche zu erreichen oder in diesem Fall den durch CRISPR/Cas9 mutierten Genabschnitt. Es wurde für die Durchführung ein *Thermocycler* und ein Standard-Mastermix (s. Tab. 19) verwendet. Eine PCR besteht aus drei Phasen: der Denaturierung, der Hybridisierung und der Polymerisation (s. Tab. 20).

Die PCR wurde bei den DLD1 Δ SMAP1- und DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zellklonen zweimalig durchgeführt, um zu gewährleisten, dass genügend des gewünschten Genabschnittes amplifiziert wurde. Anstatt der üblichen 1 µl DNA wurden 2,5 µl des

PCR-Ansatzes verwendet. Im Gegenzug wurden nur 18 µl H₂O eingesetzt, sodass das Endvolumen gleichbleibend war. Für die Vervielfältigung der DNA der Pals1-Knockout-Zellklone der SW48- und LoVo-Zelllinie genügte ein einmaliger Durchlauf.

Tabelle 19: Standard-Mastermix für die Genotypisierungs-PCR

Komponenten	Menge
DNA	1,0 µl
Primer fw, Primer rv	0,5 µl
H ₂ O	19,5 µl
AccuBuffer	2,5 µl
dNTP-Mix 10mM	0,25 µl
DMSO	0,75 µl
Accuzyme Polymerase 2.5 U/µL	0,5 µl

Tabelle 20: Thermocyclerprogramm für die Genotypisierungs-PCR

Reaktionsschritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1x
Denaturierung	95 °C	15 s	30x
Hybridisierung	55 °C	15 s	
Polymerisation	72 °C	2 min	

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde benötigt, um die vervielfältigten DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe aufzutrennen. Dazu wurde ein 2 %iges Agarose-Gel gegossen, welches vor dem Auspolymerisieren mit 2,4 µl Ethidiumbromid versetzt wurde. Zu den Proben wurde ein 6xDNA-Ladepuffer hinzugegeben und anschließend konnten die Geltaschen mit den Proben beladen werden. Danach wurde eine elektrische Spannung von 100 V angelegt, sodass die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode wanderten. Jede Base enthält eine Phosphatgruppe, sodass das Verhältnis zwischen Größe und Ladung der Moleküle proportional ist. Je kleiner das DNA-Fragment ist, desto schneller wandert es durch das Agarosegel. Der Grund liegt darin, dass größere Moleküle durch die Poren des Agarose-Gels abgebremst werden und dadurch langsamer im elektrischen Feld wandern als kleinere Moleküle. Nach Beendigung der Elektrophorese konnten die DNA-Fragmente durch das Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden, da es mit den Nukleinsäurebasen interkaliert.

3.2.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden an einem UV-Tisch mit einem Skalpell extrahiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde die DNA aus dem Gel mithilfe des *innuPREP DOUBLEpure Kit* eluiert.

3.2.9 Sequenzierung

Für die Charakterisierung der Knockout-Zellen wurden 10 µl der eluierten DNA mit 3 µl Primer (10 mM) versetzt und im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster sequenziert.

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Transformation in *Escherichia coli*

Die Transformation wird als ein Gentransfer verstanden, bei der die Aufnahme von freier DNA in ein Empfängerbakterium stattfindet. Dieser Mechanismus wird genutzt, um ein Plasmid-Konstrukt in ein Bakterium einzuschleusen, welches dann im Zuge des Bakterienwachstums unweigerlich vervielfältigt wird.

Für diese Arbeit wurden für die Transformation 100 µl kompetente *E. coli* DH10B verwendet. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und anschließend wurde 1 µl der zu amplifizierenden Plasmid-DNA hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 45 s bei 42 °C erhitzt und darauffolgend 5 min auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte eine Zugabe von 200 µl LB-Medium und eine Inkubation der Bakterien für 1 h bei 37 °C und 180 rpm. In Abhängigkeit von der Antibiotikaresistenz, die durch die Plasmid-DNA kodiert, wurden die Bakterien auf eine spezifische Antibiotika-Selektions-LB-Agarplatte mithilfe der 3-Ösen-Technik ausgestrichen. Die Antibiotika-Selektions-LB-Agarplatte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.2 Aufreinigung von Plasmid DNA

Die durch die Bakterientransformation vervielfältigte Plasmid-DNA konnte durch eine Mini-Präparation isoliert und aufgereinigt werden. Für die Mini-Präparation wurde eine Bakterienkolonie gepickt (s. Abs. 4.3.1) und in 50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf dem Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 rpm.

Dazu wurde das *NucleoBond® PC 20 Kit* verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Eluierung der Plasmid-DNA erfolgte in 50 µl H₂O. Die Konzentration der DNA wurde im Anschluss photometrisch bei 260 nm gemessen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinbestimmung mittels Bradford-Messung

Die Bradford-Messung erlaubt die Quantifizierung der Proteinkonzentration durch eine photometrische Messung der Wellenlänge [126]. Roti-Quant diente als Bradford-Reagenz und wurde zuvor in einem Verhältnis von 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Für jede Probe wurde 1 ml Roti-Quant in eine Plastik-Einwegküvette vorgelegt, mit 5 µl Probe versetzt und gevortext. Als Blank-Probe wurde 1 ml 1x Roti-Quant mit 5 µl TNT-Puffer + Protease-Inhibitor genutzt. Nach einer Inkubation von 2 min wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Der Proteingehalt wurde unter Verwendung einer Standardreihe berechnet und in µg angegeben.

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die von Laemmli entwickelte diskontinuierliche SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) wurde angewendet, um Proteine nach ihrer Molekülmasse aufzutrennen [127].

Durch die Zugabe von Laemmli-Puffer und das Aufkochen der Zelllysate (s. Abs. 4.1.5) wurde die Denaturierung der Proteine erreicht, sodass die Faltungsstrukturen destruiert wurden. Zudem gibt das im Laemmli vorhandene SDS den Proteinen eine negative Gesamtladung, wodurch die Größenauftrennung in einem elektrischen Feld ermöglicht wurde. Als Trägermedium wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel verwendet, welches aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestand (s. Tab. 21). Die beiden Gele differenzieren sich in Bezug auf den pH-Wert und der Acrylamidkonzentration. Im Sammelgel, welches sich durch einen neutralen pH-Wert und einen geringen Acrylamidanteil (5 %) auszeichnet, wurden die Proben in Geltaschen aufgetragen und nach Anlegen der Spannung auf einer Ebene fokussiert. Das anschließende Trenngel weist einen basischen pH-Wert und eine feinporigere Vernetzung auf. Im Trenngel wurden die negativ geladenen Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe, welche proportional zur Geschwindigkeit ist, dissoziiert.

Der Acrylamidanteil im Trenngel kann in Bezug auf die Molekülmasse der zu detektierenden Proteine variiert werden. Hierfür wird das folgende Prinzip verwendet: Je größer der Anteil, desto kleiner sind die Poren und desto langsamer wandern die

Proteine in Richtung Anode. Für die zu detektierenden Proteine in dieser Arbeit wurden 10 %ige und 13,5 %ige Trenngel verwendet.

Zu Beginn der SDS-PAGE wurde, bis die Lauffront die Grenzschicht zum Trenngel erlangt hatte, eine elektrische Spannung von 100 V angelegt. Anschließend wurde die Spannung auf 150-170 V angehoben, bis die Proteine das Ende des Gels erreicht hatten. In dieser Arbeit wurden 10 µl der zu analysierenden Proben aufgetragen und es wurde parallel 3 µl *Page Ruler™ Plus Prestained Protein ladder* als Größenstandard eingesetzt.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Sammelgele und Trenngel für die SDS-PAGE

Komponenten Angaben in ml	Sammelgel (5 %)	Trenngel 10 %	Trenngel 13,5 % Für 1 Gel
H ₂ O	1,4	2	1,4
Acrylamid	0,33	1,6875	2,25
1M Tris (pH 6,8)	0,25		
1,5 M Tris (pH 8,8)		1,25	1,25
SDS (10 %)	0,02	0,05	0,05
APS	0,02	0,05	0,05
TEMED	0,002	0,001875	0,002

3.4.3 Western Blot

Im Anschluss der SDS-Page (s. Abs. 4.4.2) startete die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran durch das *semi-dry*-Verfahren. Bei dieser Arbeit wurde eine 0,2 µm Nitrocellulose-Membran verwendet, die zuvor kurzzeitig mit vier Blotting-Papieren pro Gel in Transferpuffer getränkt wurde.

Die *semi-dry*-Apparatur wurde auf der Anodenseite wie folgt bestückt: zwei Blotting-Papiere, die Nitrocellulose-Membran, das Acrylamidgel und zwei weitere Blotting-Papiere. Daraufhin wurden Luftblasen, die sich evtl. zwischen den Lagen befanden, ausgestrichen und der Deckel der Apparatur (Kathodenseite) mit Bedacht auf den Stapel gelegt.

Mit dem Anlegen der Spannung wanderten die Proteinbanden senkrecht aus dem Acrylamidgel auf die Nitrocellulose-Membran, wo sie dauerhaft gebunden wurden. Für ein Gel wurde eine Spannung von 72 mA und eine Zeit von 1:40 h gewählt.

3.4.4 Immundetektion durch spezifische Antikörper

In Abhängigkeit von der Proteingröße und den zu testenden Antikörpern, wurde die Nitrocellulose-Membran im Anschluss an das *semi-dry*-Verfahren mithilfe eines Skalpells zerschnitten. Bei dem nachfolgenden Blockierungsschritt wurden die Membranstücke für 1 h bei Raumtemperatur in einer 5 % BSA-Lösung, unter leichtem Schütteln inkubiert. Die BSA-Lösung wird verwendet, damit spätere unspezifische Antikörper-Bindungsstellen auf der Membran reduziert werden. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und anschließender Lagerung über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Der Primärantikörper bindet sich an spezielle Epitope im gesuchten Protein und lag in einer individuellen Verdünnungsstufe in der BSA-Lösung vor.

Nach der Inkubation wurden die Primärantikörper abgenommen, bei -20 °C gelagert und konnten für weitere Immundetektionen später wiederverwendet werden. Daraufhin wurde die Membran insgesamt dreimal für 5 min unter Schütteln mit 1x TBST gewaschen, um dann mit dem Sekundärantikörper fortzufahren. Dazu wurden die entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper mit der BSA-Lösung 1:2000 verdünnt und für 30-60 min bei RT unter leichtem Schütteln auf die Membran gegeben. Nach erneuten Waschschritten, die dreimal für je 5 min durchgeführt wurde, konnten die Proteinesignale schließlich mithilfe der Chemilumineszenzreaktion gemessen werden.

Dazu wurde nach Herstellerangaben die Membran mit der Clarity-Lösung bzw. bei schwachen Signalen mit der Clarity-Max-Lösung behandelt. Das Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) katalysiert in Anwesenheit von Peroxid die Oxidation von Luminol, welches dann Licht erzeugt. Die Auswertung erfolgte mit einem Lumineszenzimager, der die emittierte Chemilumineszenz detektierte. Die Intensität der Proteinbanden wurde mithilfe der Computersoftware ImageJ ermittelt.

3.5 GST-Pulldown-Assay

3.5.1 Grundlagen des GST-Pulldown-Assays

Der GST-Pulldown-Assay wurde angewendet, um das Aktivitätslevel der kleinen GTPasen Rac1 und Arf6 in den verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien zu eruieren. GTPasen werden als molekulare Schalter verstanden, die im ständigen Wechsel zwischen einem GTP-gebundenen aktiven Zustand und einem GDP-gebundenen inaktiven Zustand stehen [74]. Die Methode basiert auf der Affinität der aktiven GTPasen auf nachgeschaltete Effektorproteine. Die Effektorproteine werden als sogenannte GST-Fusionsproteine im bakteriellen Expressionssystem hergestellt und an Glutathion-Agarose immobilisiert. Durch eine Protein-Protein-Interaktion werden die aktiven GTPasen präzipitiert und können mittels einer Western Blot Analyse detektiert werden.

3.5.2 Expression und Aufreinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen in prokaryotischen Zellen

Das rekombinante GST-Fusionsprotein wird in einem Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren Expressionsvektor mithilfe des pGex-Vektorsystems kloniert. Der Expressionsvektor beinhaltet sowohl das Gen Glutathion-S-Transferase (GST), als auch das Gen für das gewünschte Effektorprotein.

Für die Präzipitation von Rac1-GTP wurde das PAK1-Fusionsprotein verwendet, wohingegen für Arf6 das GGA3-Fusionsprotein genutzt wurde. Zur Amplifikation wurden die Fusionsproteine in Rosetta-Bakterien transformiert (s. Abs. 4.3.1).

Nachdem die Bakterien über Nacht auf eine Antibiotika-Selektions-LB-Agarplatte angewachsen waren, wurde eine Bakterienkolonie gepickt und in ein Bakterien-Röhrchen transferiert, welches 5 ml LB-Medium und Ampicillin (1:1000) enthielt. Das Bakterien-Röhrchen wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, sodass am nächsten Tag 200 μ l der Bakteriensuspension in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium und Ampicillin (1:1000) überführt werden konnte. Die Inkubation erfolgte für 2-3 h bei 37 °C und 180 rpm, damit ein ausreichendes Bakteriumwachstum gewährleistet werden konnte. Beim Erreichen einer OD von 0,6 im Wellenbereich von 600_{nm} wurde die Inkubation gestoppt. Danach erfolgte die Zugabe von 100 μ l IPTG, welches zur Induktion der GST-Fusionsproteinproduktion führte. Im Anschluss wurde

die Bakterienkultur mit dem Arf6-Fusionsprotein über Nacht bei 18 °C und 180 rpm bzw. mit dem Rac1-Fusionsprotein für 3 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in einem 50 ml Falcon herunterzentrifugiert und dann für mindestens 30 min bei - 80 °C eingefroren.

Zur Freisetzung der GST-Fusionsproteine, mussten die Bakterien mittels Ultraschallwellen lysiert werden. Dazu wurde die Bakteriensuspension auf Eis gestellt und mit 5 ml TNT-Puffer mit Protease-Inhibitor resuspendiert. Die Ultraschallbehandlung wurde viermal für jeweils 30 s mit einem *Sonicator* durchgeführt. Daraufhin wurden die Bakterien für 4 °C und 15 min bei 10.600 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurden die *Beats* vorbereitet, indem 30 µl der Glutathione-Agarose in ein Reaktionsgefäß pipettiert und einmal mit 500 µl PBS und zweimal mit 500 µl TNT-Puffer gewaschen wurde. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand der lysierten Bakteriensuspension auf die *Beats* gegeben, indem 1 ml auf 30 µl *Beats* verteilt wurde. Für die Immobilisierung der GST-Fusionsproteine an die Glutathione-Agarose, wurden die *Beats* für 2 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Inkubation schloss sich ein viermaliger Waschschrift mit TNT-Puffer an. Zur Überprüfung einer ausreichenden GST-Fusionsproteinkonzentration wurden 10 µl der *Beats* abgenommen, mit 2xLaemmli-Puffer versetzt und auf ein 13,5 % SDS-Gel aufgetragen (s. Abs. 4.4.2). Nach der *SDS-PAGE* wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt, welche eine Standardmethode darstellt, um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine sichtbar zu machen. Die fertiggestellten *Beats* wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

3.5.3 Durchführung des Pulldown-Assays

Die Basis für den Pulldown-Assay stellten 10 cm Petrischalen mit einer Zielkonfluenz von 100 % dar. Die Zelllysate wurden wie in 4.1.5.1 beschrieben, hergestellt. Anschließend wurde das Proteinlevel über die Bradford-Methode bestimmt (s. Abs. 4.4.1) und so angepasst, dass die zu parallelisierenden Zelllinien eine identische Proteinkonzentration aufwiesen. Für die Darstellung des endogenen totalen Proteinlevels (*Input*) der zu detektierenden GTPase, wurde 40 µl des Zelllysates in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 2xLaemmli-Puffer (1:1) versetzt und bei - 80 °C eingefroren. 320 µl Zelllysate wurden hingegen auf die jeweiligen *Beats* gegeben und für 2 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine

Zentrifugation der *Beats* und der nun präzipitierten aktiven GTPase für 2 min bei 4 °C und 5000 rpm. Dem schloss sich ein dreimaliger Waschschrift an, der mit 1 ml TNT-Puffer durchgeführt wurde. Anschließend wurden die *Beats* mit 35 µl 2xLaemmli-Puffer versetzt, bei -20 °C eingefroren oder direkt für eine *SDS-PAGE* (s. Abs. 4.4.2) und einer anschließenden Western Blot Analyse (s. Abs. 4.4.3, 4.4.4) verwendet.

3.6 Statistische Datenauswertung

Für die Erstellung der Graphen und die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism 5 genutzt, die von GraphPad Software, Inc. erstellt wurde. Alle Versuche wurden unabhängig voneinander mindestens dreimal durchgeführt (die Anzahl der Versuche wird mit $n = x$ angegeben). Die Ergebnisse der Migrations- und der Invasionsversuche wurden als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*) berechnet. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse der Knockout-Zellen der Western Blot Experimente als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*) bestimmt.

Für die Statistikberechnung zweier Gruppen wurde der ungepaarte T-Test angewendet. Für die Statistikberechnung zwischen mehr als zwei Gruppen wurde der *One-way ANOVA-Test (Bonferroni-Compare selected pairs of columns)* verwendet. Die statistische Signifikanz wird mit den folgenden Signifikanzniveaus angegeben: einfach signifikant: $* < 0,05$; zweifach signifikant: $** < 0,01$; dreifach signifikant: $*** < 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Verlust von Pals1 führt zu einer verstärkten Zellmotilität *in-vitro* und *in-vivo* („Vorarbeiten“)

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Gewebeproben von Darmkrebspatienten auf die Expression von Pals1 histopathologisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Mehrzahl der menschlichen Kolonkarzinomproben eine verringerte Pals1-Expression im Krebsstadium G3 aufwies, sodass sich das Interesse von Pals1 im Hinblick auf die Tumorprogression intensivierte [114]. Um den Einfluss von Pals1 auf die Karzinogenese zu validieren, wurde in der HCT116-Kolonkarzinomzelllinie mit der CRISPR/Cas9-Methode ein Pals1-Knockout erstellt. Mit der Durchführung verschiedener Experimente konnte gezeigt werden, dass der Pals1-Knockout in den HCT116-Zellen in einer signifikant verstärkten Zellmigration und -invasion reflektiert wird. Dazu wurden sowohl *in-vitro* Versuche (Migrations-, Single-Zell-Migrations-, Invasionsassays), als auch *in-vivo* Versuche (Mausmodell) durchgeführt [113, 114]. Mithilfe von GST-Pulldown-Assays, Inhibitor-Experimenten und Immunfluoreszenzfärbungen konnte ein Zusammenhang zwischen Pals1 und den GTPasen Rac1 und Arf6 eruiert werden. Bei der HCT116 Δ Pals1-Zelllinie wurde ein erheblich hochreguliertes aktives Rac1- und Arf6-Proteinlevel im Vergleich zu der WT-Zelllinie gemessen [113].

Mit dieser Arbeit soll die Bedeutung von Pals1 und der Phänotyp der HCT116 Δ Pals1-Zelllinie unter Verwendung weiterer heterogener Kolonkarzinomzelllinien amplifiziert werden. Mithilfe der CRISPR/Cas9-Methode wurden im Vorfeld dieser Arbeit bereits folgende Zelllinien generiert: DLD1 Δ Pals1, Caco-2 Δ Pals1, RKO Δ Pals1 [128, 129].

4.2 Charakterisierung von weiteren Pals1-Knockout Kolonkarzinomzelllinien in Bezug auf ihr onkogenes Potential

4.2.1 Analyse der Migrations- und Invasionskapazität

Um die Tumorgenität der bereits generierten Knockout-Zellen (DLD1 Δ Pals1, Caco-2 Δ Pals1, RKO Δ Pals1) zu eruieren, wurden die Zellen im direkten Vergleich mit den WT-Zelllinien auf ihre Migrations- und Invasionskapazität untersucht.

Der Migrationsassay wurde mithilfe von industriell entworfenen *2 well culture-inserts* durchgeführt, wodurch ein exakter Spalt von 500 μ m geschaffen wurde (s. Abs. 4.1.6). Eine definierte Zellzahl der WT-Kontrolle und der Knockout-Zelllinie wurde in die *2 well culture-inserts* ausgesät und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Die Migrationsgeschwindigkeit wird determiniert durch die Lokomotion der Krebszellen in den Spaltraum innerhalb der Inkubationszeit.

Für den Invasionsassay wurden spezielle ThinCert™ Zellkultureinsätze genutzt, welche mit einem Basalmembranextrakt (BME) beschichtet waren, das zu einer Basalmembran polymerisiert. Angetrieben von einem chemoattraktiven Gradienten invasierten die Krebszellen durch die Basalmembran und der nachfolgenden Porenmembran, um schließlich an der Membranunterseite zu adhären. Kristallviolett wurde als Indikator genutzt, der die adhären Zellen anfärbte. Die Farbintensität reflektiert letztendlich die Invasionsbereitschaft der Zellen (s. Abs. 4.1.7).

Der Migrationsversuch der DLD1-Zelllinien wird in Abbildung 7 A und B dargestellt. Die Abbildung 7 A veranschaulicht exemplarische Auszüge aus den mikroskopischen Aufnahmen des Migrationsexperimentes, während das Diagramm in Abbildung 7 B den Assay aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen quantifiziert. Für den Migrationsassay wurden die DLD1-Zellen für 13,5 h inkubiert. Die Abbildungen 7 A und B visualisieren, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der WT- und der Δ Pals1-Zelllinie im Hinblick auf die Migrationsfähigkeit besteht.

Der Invasionsversuch der entsprechenden Zelllinien wird in Abbildung 7 C und D aufgezeigt. Die DLD1-Zellen wurden für den Invasionsassay insgesamt 56 h inkubiert und es wurde ein 10 % FCS-haltiges Medium eingesetzt. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen ist zu sehen, dass die DLD1-Zellen eine konstitutive Fähigkeit zur Invasion

besitzen. Jedoch kann den Abbildungen 7 C und D entnommen werden, dass der Pals1-Verlust nicht zu einer erhöhten Invasionsbereitschaft führt.

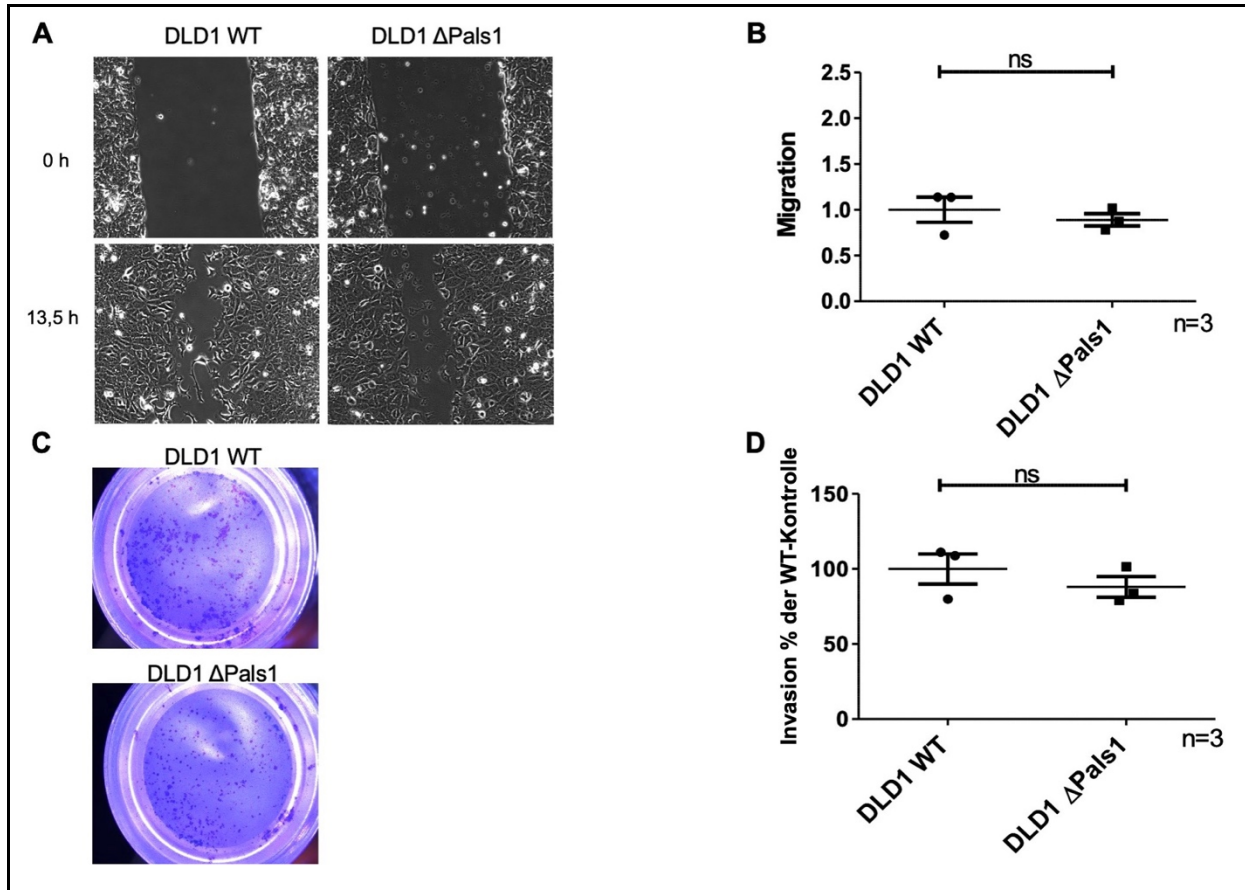


Abbildung 7: Migrationsassay und Invasionsassay von DLD1 WT/ DLD1 Δ Pals1

(A, B) Mikroskopische Auszüge (s. Abb. 7 A) und graphische Darstellung des Migrationsassays (s. Abb. 7 B). Es wurden 50.000 Zellen ausgesät und die Aufnahmen wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 13,5 h angefertigt. Die Migrationsgeschwindigkeit wurde anhand der mikroskopischen Aufnahmen unter Verwendung der Computersoftware ImageJ in μm und in Echtzeit berechnet. Die Quantifizierung der Migrationsfähigkeit erfolgte durch die Normierung der WT-Zelllinie auf den Wert eins. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

(C, D) Optische Präsentation der mit Kristallviolett angefärbten Zellkultureinsätze (s. Abb. 7 C) und graphische Darstellung des Invasionsassays (s. Abb. 7 D). Es wurden 500.000 Zellen in den Zellkultureinsätzen ausgesät, welche anschließend für 56 h inkubiert wurden. Die Auswertung der Invasionskapazität erfolgte durch die Normierung der WT-Zelllinie auf 100 %. Der Assay wurde dreimal unabhängig voneinander ausgeführt.

Der Migrations- und Invasionsversuch der Caco-2 WT- und Caco-2 Δ Pals1-Zelllinien wird in Abbildung 8 präsentiert.

Für den Migrationsversuch wurden die Caco-2 WT- und Caco-2 Δ Pals1-Zelllinien für 24 h inkubiert. Die Abbildung 8 B veranschaulicht die quantifizierte Auswertung von

drei Migrationsversuchen und veranschaulicht, dass beide Zelllinien eine nahezu identische Migrationsgeschwindigkeit aufweisen. Dementsprechend besteht keine Divergenz zwischen den Zelllinien in Bezug auf das Migrationsverhalten.

Durch die Verwendung einer langen Inkubationszeit (96 h) und einer erhöhten FCS-Konzentration (20 %), im Vergleich zu den DLD1-Zellen, konnte eine Invasionsbereitschaft der Caco-2-Darmkrebszellen quantifiziert werden. Bei der amplifizierten Darstellung lässt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Invasionskapazität zwischen der Caco-2 WT- und der abgeleiteten Pals1-Knockout-Zelllinie verifizieren (s. Abb. 8 D).

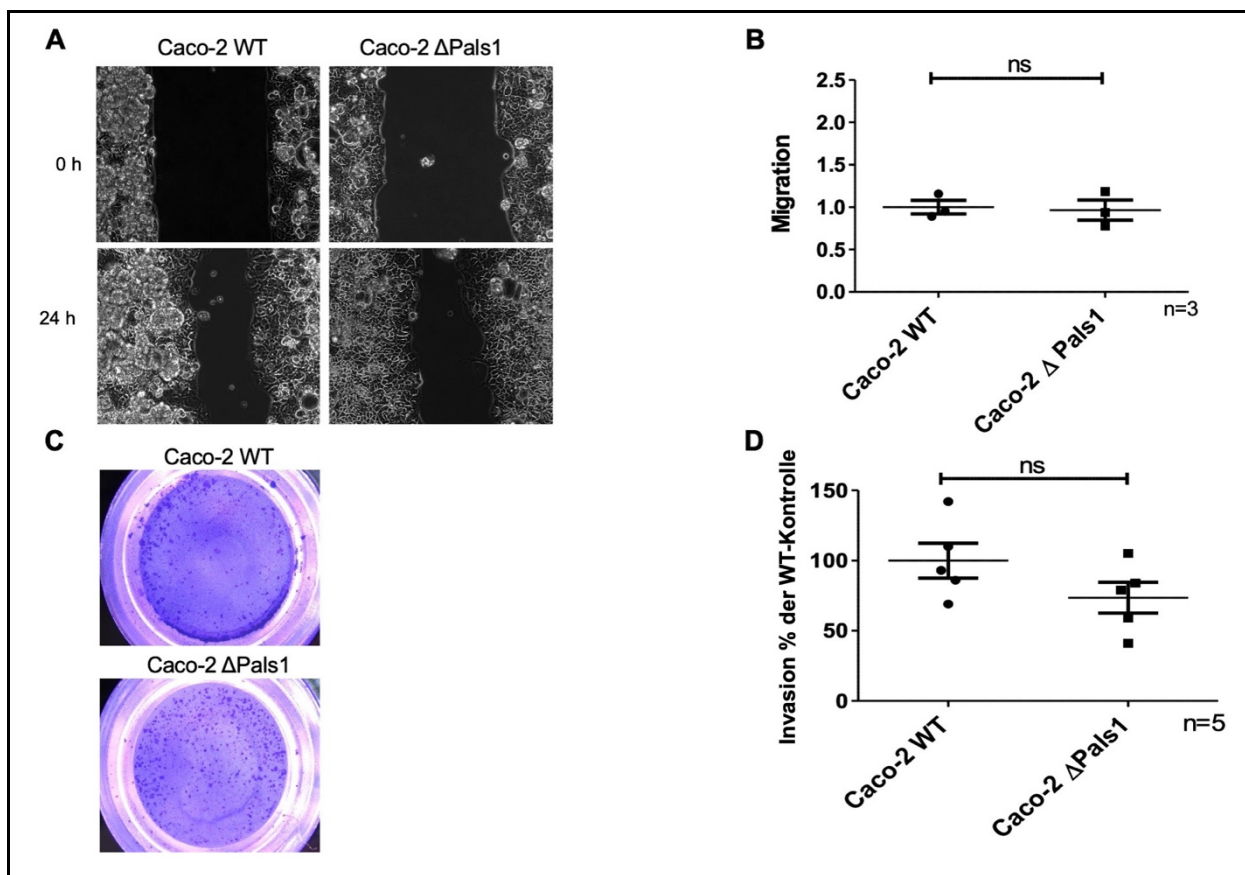


Abbildung 8: Migrationsassay und Invasionsassay von Caco-2 WT/ Caco-2 Δ Pals1

(A, B) Mikroskopische Aufnahmen (s. Abb. 8 A) und graphische Darstellung des Migrationsassays (s. Abb. 8 B). Für den Versuch wurden 80.000 Zellen ausgesät und die Bilder wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 24 h aufgenommen. Unter Verwendung der mikroskopischen Bilder wurde die Zellmigration in μm und in Echtzeit mit der Computersoftware ImageJ berechnet. Die graphische Darstellung der Migrationsfähigkeit erfolgte durch die Normierung der WT-Zelllinie auf den Wert eins. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

(C, D) Übersichtsaufnahmen der mit Kristallviolett angefärbten Zellkultureinsätze (s. Abb. 8 C) und graphische Aufführung des Invasionsassays (s. Abb. 8 D). Für den Assay wurden 500.000 Zellen ausgesät und für 96 h inkubiert. Als *Chemoattractant* wurde ein Medium gewählt, dass mit 20 % FCS

versetzt wurde. Die Auswertung der Invasionsfähigkeit erfolgte durch die Normierung der WT-Zelllinie auf 100 %. Der Assay wurde fünfmal unabhängig voneinander ausgeführt.

In Vorarbeiten wurde der Migrations- und Invasionsassay gleichermaßen in den RKO WT- und RKO Δ Pals1-Zelllinien durchgeführt [128]. Beide Assays manifestierten, dass keine signifikante Differenz, zwischen der WT- und der Pals1-Knockout-Zelllinie besteht. Die in dem Abschnitt aufgeführten Experimente authentifizieren, dass der Pals1-Verlust in den DLD1-, Caco-2- und RKO-Zellen nicht in eine verstärkte Zellmotilität reflektiert wird.

4.2.2 Rolle von Rac1 und Arf6 unter Verwendung des GST-Pulldown-Assays

Der GST-Pulldown-Assay basiert auf einer Protein-Protein-Interaktion, bei dem eine aktive GTPase von einem rekombinanten GST-Fusionsprotein immobilisiert wird. Letztlich kann das aktive, präzipitierte Protein mittels Western Blot Analyse gemessen werden. Das GTPase-Gesamtproteinlevel differenziert nicht zwischen aktivem und inaktivem Zustand und wird parallel zum aktiven, präzipitierten Protein betrachtet und diesem gegenübergestellt.

Wie bereits beschrieben, wird die hochregulierte Rac1- und Arf6-Proteinexpression in den HCT116 Δ Pals1-Zellen im Zusammenhang mit der verstärkten Zellmotilität vermutet (s. Abs. 5.1). Durch die Verwendung des GST-Pulldown-Assays soll untersucht werden, ob der Pals1-Verlust in den DLD1-, RKO- und Caco-2-Zellen ebenfalls einen Effekt auf die Rac1- und/oder Arf6-Aktivität hat. Die Zellen wurden für den Assay auf eine 10 cm Petrischale bis zur Zielkonfluenz von 100 % kultiviert und mit TNT-Puffer + Protease-Inhibitor lysiert (s. Abs. 4.1.5.1). Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden durch die Bradford-Messmethode angleichend eingestellt, sodass ein direkter Vergleich der Zelllinien untereinander realisierbar ist (s. Abs. 4.4.1).

Als erstes wurden die DLD1-, RKO- und Caco-2-Zellen auf ihr totales und aktives Rac1-Level untersucht. Der exemplarische Western Blot Auszug (s. Abb. 9 A) veranschaulicht, dass kein Rac1-Expressionsunterschied zwischen den WT-Zellen und den Deletionsmutanten vorliegt, sowohl im endogenen Level als auch im Aktivitätszustand. Bei den RKO WT- und der ableitenden Knockout-Zelllinie wurde insgesamt nur ein sehr schwach aktives Rac1-Signal detektiert. Die densitometrische

Quantifizierung der Proteinintensität gibt das relative Verhältnis von totalem Rac1 und aktivem Rac1 aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen wieder (s. Abb. 9 B, C). Die Grafiken verdeutlichen allesamt, dass keine relevante Abweichung zwischen den WT- und den Knockout-Zellen besteht.

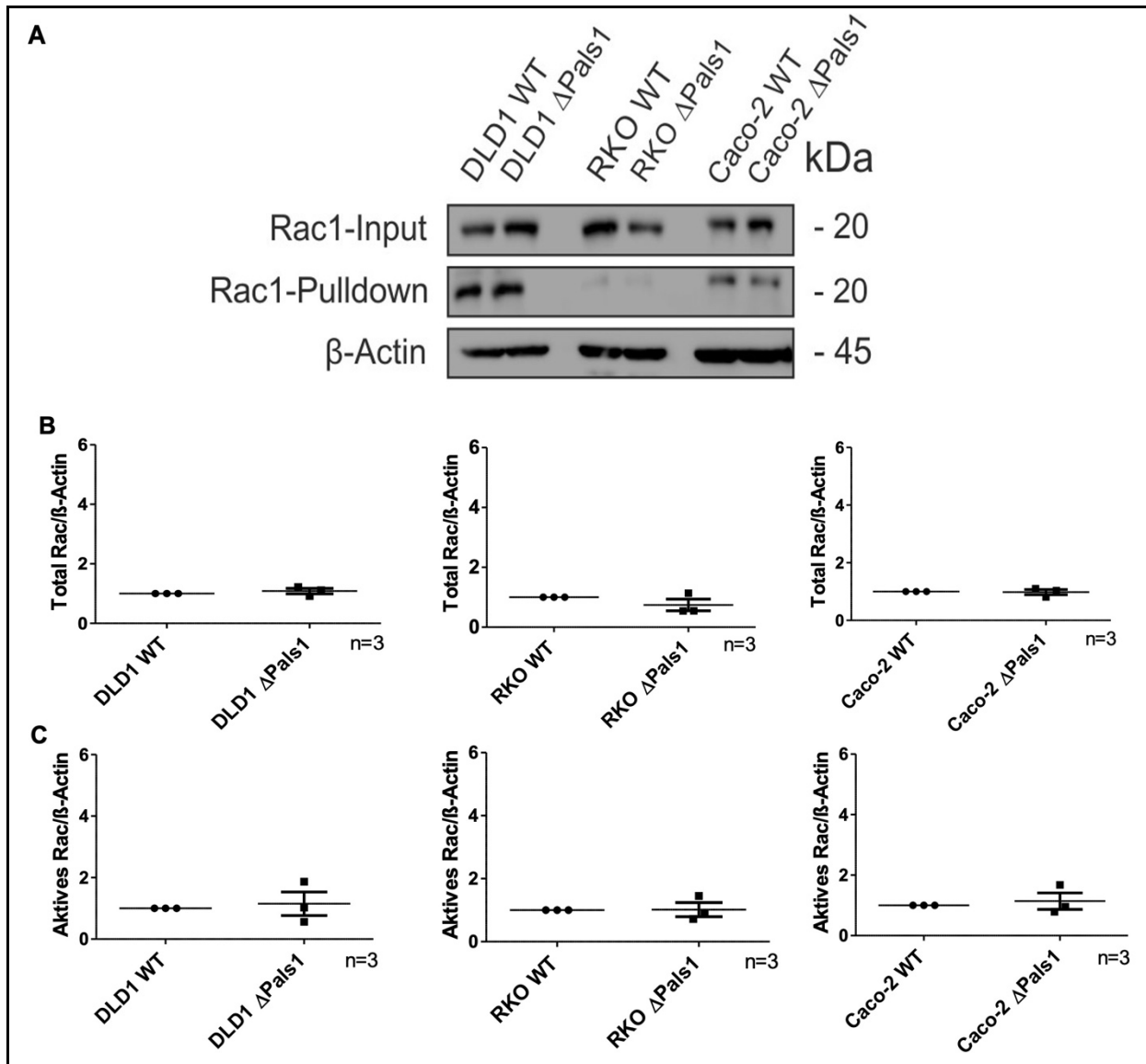


Abbildung 9: Nachweis des totalen und aktiven Rac1-Llevels via GST-Pulldown-Assay bei DLD1 WT/ Δ Pals1, RKO WT/ Δ Pals1, Caco-2 WT/ Δ Pals1

(A) Die Expression von endogenem Rac1 (obere Spur) und aktivem Rac1 (mittlere Spur) wurde durch die Western Blot Analyse untersucht. Als Primärantikörper wurde ein panRac-Antikörper verwendet und als Ladekontrolle wurde β -Actin genutzt. Für die SDS-Page wurde ein 13,5 % iges Gel ausgewählt.

(B, C) Die Proteinintensität wurde durch eine densitometrische Analyse unter Verwendung von ImageJ quantifiziert. Veranschaulicht wird die Quantifizierung des totalen Rac1-Llevels (s. Abb. 9 B) und des aktiven Rac1-Llevels (s. Abb. 9 C). Die Rac1-Expression wurde in Bezug auf β -Actin standardisiert. Das relative Rac1-Verhältnis der WT-Zelllinie wurde auf den Wert eins normiert, damit eine direkte

Abweichung der Deletionsmutanten betrachtet werden kann. Der Western Blot wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Im Anschluss an den Rac1 GST-Pulldown-Assay wurden die DLD1-, RKO -und Caco-2-Zellen auf ihr gesamtes und aktives Arf6-Level getestet. In Abbildung 10 A wird ein repräsentativer Western Blot des Arf6 GST-Pulldown-Assays dargestellt, welcher erkennen lässt, dass die Deletionsmutanten kein verstärktes exprimiertes totales bzw. aktives Arf6-Level aufweisen. Während ein deutliches totales Arf6-Signal demarkiert werden kann, ist augenscheinlich kaum aktives Arf6 in den verschiedenen Darmkrebszelllinien zu lokalisieren.

Die quantitativen Amplifikationen in Abbildung 10 B und C spiegeln das relative Verhältnis von totalem Arf6 und aktivem Arf6 aus sechs bzw. acht unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen wider. Die Abbildung 10 B veranschaulicht die Quantifizierung der Arf6-Proteingesamtmenge, wohingegen die Abbildung 10 C die Quantifizierung des aktiven Arf6-Levels signalisiert. Den verschiedenen Graphen kann entnommen werden, dass kein Expressionsunterschied zwischen WT und Pals1-Knockout vorliegt. Dieser Kenntnisstand trifft auf alle Kolonkarzinomzelllinien zu. Die DLD1 Δ Pals1-Zelllinie zeigt insgesamt eine schwankende Expression von aktivem Arf6 (s. Abb. 10 C). Allerdings zeigt das relative Verhältnis der acht Versuche auf, dass keine Hoch- oder Herunterregulation von aktivem Arf6 vorhanden ist.

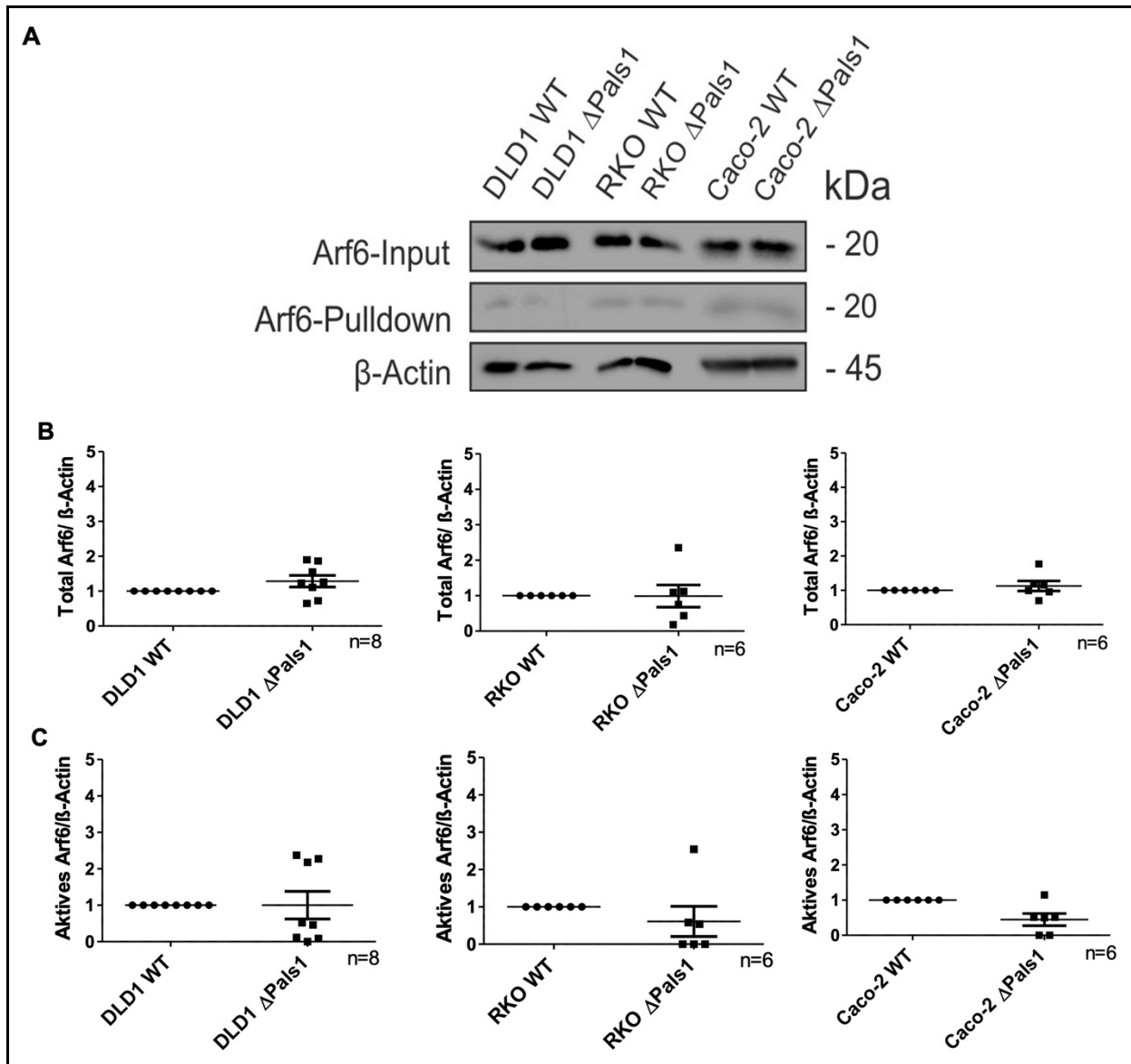


Abbildung 10: Nachweis von totalen und aktiven Arf6-Level via GST-Pulldown-Assay bei DLD1 WT/ Δ Pals1, RKO WT/ Δ Pals1, Caco-2 WT/ Δ Pals1

(A) Unter Verwendung einer Western Blot Analyse wurden die Expression von totalem Arf6 (obere Spur) und aktivem Arf6 (mittlere Spur) analysiert. Als Primärantikörper wurde ein Arf6-Antikörper ausgewählt und β -Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Für die SDS-Page wurde ein 13,5 % iges Gel verwendet.

(B, C) Dargestellt wird die densitometrische Quantifizierung der Proteinintensität von dem endogenen Arf6-Level (s. Abb. 10 B) und dem aktiven Arf6-Level (s. Abb. 10 C). Das Arf6-Level wurde in Bezug auf β -Actin standardisiert. Das relative Arf6-Verhältnis der WT-Zelllinie wurde auf den Wert eins normiert, damit eine direkte Abweichung der Deletionsmutanten betrachtet werden kann. Der Western Blot wurde achtmal bei den DLD1-Zelllinien und sechsmal bei den RKO- und Caco-2-Zelllinien unabhängig voneinander durchgeführt.

4.3 Die Bedeutung von SMAP1 in Pals1-defizienten Zellen

Wie in Abschnitt 5.2 dargestellt wurde, korreliert der Pals1-Verlust in den DLD1-, RKO- und Caco-2-Krebszellen nicht mit einer erhöhten Zellmotilität bzw. Hoch- oder Herunterregulation von aktivem Rac1 und Arf6. Resümierend zeigen diese Pals1-Knockout-Zelllinien ein inkomparables Verhalten zu der HCT116 Δ Pals1-Zelllinie. Eine Literaturrecherche manifestiert mögliche Hinweise auf den Einfluss einer spezifischen ArfGAP namens SMAP1, welche für die spezifische Inaktivierung von Arf6 zuständig ist [94, 102]. *Sangar et al.* führten eine umfangreiche Studie des SMAP1-Gens durch, wobei insbesondere in Kolonkarzinomzelllinien SMAP1-Mutationen identifiziert wurden. Es konnten sowohl biallelische SMAP1-Mutationen (HCT116, LoVo, SW48, etc.), als auch monoallelische Mutationen (RKO etc.) lokalisiert werden [94]. Die DLD1- und die Caco-2-Zelllinien verfügen hingegen über ein SMAP1-Gen mit WT-Allelen. Angesichts dieser Informationen besteht die Annahme, dass der zusätzliche SMAP1-Verlust in den HCT116 Δ Pals1-Zellen die Explikation für eine erhöhte Zellmigration und -invasion darstellt.

Um die Rolle von SMAP1 in den DLD1 Δ Pals1, RKO Δ Pals1 und Caco-2 Δ Pals1 zu eruieren, wurde eine Western Blot Analyse in Zusammenhang mit den WT-Zelllinien durchgeführt (s. Abb. 11). Die Zellen wurden für die Analyse auf eine 10 cm Petrischale bis zur Zielkonfluenz von 100 % kultiviert und mit TNT-Puffer + Protease-Inhibitor lysiert (s. Abs. 4.1.5.1). Mithilfe der Bradford-Messung wurde die Proteinkonzentration von den zu parallelisierenden Zelllinien analog eingestellt (s. Abs. 4.4.1).

Der exemplarische Western Blot veranschaulicht maßgebliche Unterschiede in der SMAP1-Expression (s. Abb 11 A). Im Vergleich zu den WT-Zellen konnte in allen Δ Pals1-Zelllinien ein erhöhtes SMAP1-Level detektiert werden. Die Grafiken in Abbildung 11 B verdeutlichen die Diskrepanz zwischen den WT- und Pals1-Knockout-Zellen aus drei bzw. vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Insbesondere die DLD1 Δ Pals1-Zelllinie visualisiert eine mittlere SMAP1-Hochregulation über das Zweifache, während die RKO Δ Pals1-Zelllinie eine 1,7-fache SMAP1-Überexprimierung veranschaulicht (s. Abb. 11 B). Demgegenüber wurde bei der Caco-2 Δ Pals1-Zelllinie, im Vergleich zu den anderen Zelllinien, der niedrigste

SMAP1-Anstieg gemessen (circa 1,3-fach, s. Abb. 11 B). Allerdings ist der SMAP1-Anstieg in der Caco-2 Δ Pals1-Zelllinie visuell flagrant zu lokalisieren (s. Abb. 11 A).

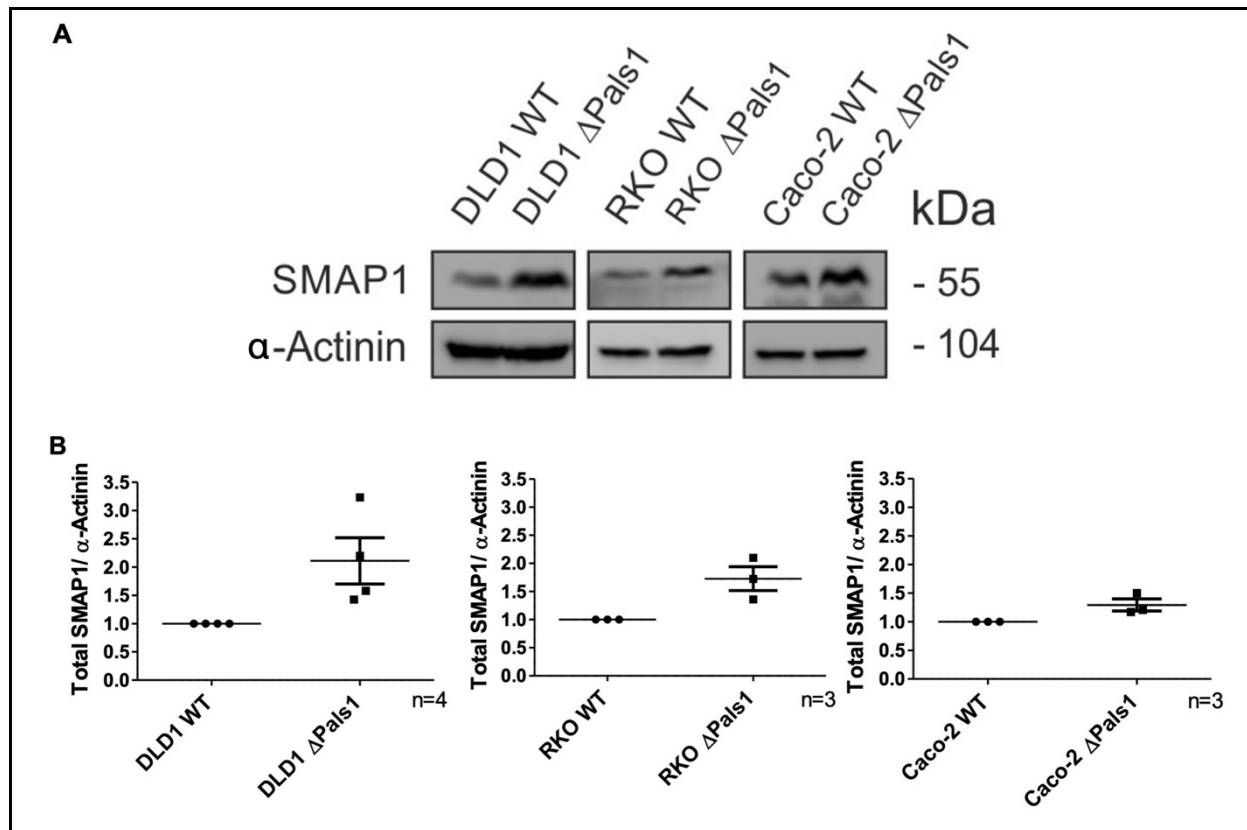


Abbildung 11: Vergleichende Western Blot Analyse der WT-Zelllinien DLD1, RKO- und Caco-2 mit den abgeleiteten Pals1-Knockout-Zellen

(A) Exemplarischer Western Blot durchgeführt mit einem Primärantikörper gegen SMAP1, um eine unterschiedliche Proteinexpression zu ermitteln. Als Ladungskontrolle wurde α -Actinin verwendet. Für die SDS-Page wurde ein 13,5 % iges Gel verwendet.

(B) Quantitative Amplifikation der SMAP1-Proteinintensität, welche in Bezug zur Ladekontrolle standardisiert wurde. Das relative SMAP1-Verhältnis der WT-Zelllinie wurde auf den Wert eins normiert, damit eine unmittelbare Abweichung der ableitenden Knockout-Zellen demarkiert werden kann. Der Western Blot wurde viermal bei den DLD1-Zellen und dreimal bei den RKO- und Caco-2-Zellen unabhängig voneinander durchgeführt.

4.4 Anwendung der CRISPR/Cas9-Mutagenese zur Analyse der Relevanz von Pals1 und SMAP1 auf die Tumorprogression

Bei dem CRISPR/Cas9-System handelt es sich um eine revolutionäre Genomeditierungsmethode, mit der spezielle Veränderungen am Genom, unter anderem ein Gen-Knockout, erzeugt werden können (s. Abs. 4.2.1).

Um das Verständnis von Pals1 und SMAP1 zu vertiefen, wurden verschiedene Knockout-Zelllinien mithilfe der CRISPR/Cas9-Technologie generiert. Dabei wurde das Ziel verfolgt, Zelllinien zu etablieren, die über ein Pals1- und ein SMAP1-Defizit verfügen, in Assoziation zu der HCT116 Δ Pals1-Zelllinie.

Die Zelllinien wurden mit den CRISPR/Cas9-Konstrukten transfiziert und im Anschluss mit Puromycin selektioniert (s. Abs. 4.2.3, 4.2.4). Herangewachsene Zellklone wurden einzeln, weiterkultiviert und unter Verwendung einer Western Blot Analyse (s. Abs. 4.4.3) und einer Genotypisierung (s. Abs. 4.2.5 bis 4.2.9) charakterisiert. Primär wurde eine Western Blot Analyse praktiziert, mithilfe der Herstellung von Zelllysaten mit 1xLaemmli-Puffer (s. Abs. 5.4.1.1), um eine erste Vorstellung über die Anzahl positiver Knockout-Zellklone zu erlangen. Das Fehlen der klassischen Proteinbande manifestiert einen positiven Knockout auf Proteinebene. Sekundär wurde eine Sequenzierung potentieller Knockout-Zellen durchgeführt, damit eine evtl. stattgefundenen strukturelle Chromosomenaberration eruiert werden konnte. Mittels speziell designter Sequenzierungsprimer (s. Abs. 3.9) wird der Bereich um die CRISPR-Bindungsstellen gezielt amplifiziert, welcher im Anschluss detailliert evaluiert werden kann.

4.4.1 Inaktivierung von SMAP1 in DLD1 WT, DLD1 Δ Pals1

Sowohl die DLD1 WT-Zelllinie als auch die bereits mutierte DLD1 Δ Pals1-Zelllinie verfügen über ein funktionsfähiges SMAP1-Gen. Mittels der CRISPR/Cas9-Methode wurde das SMAP1-Gen in den beiden Zelllinien ausgeschaltet. Das Endresultat symbolisiert zum einen die DLD1 Δ SMAP1- und zum anderen die Doppel-Knockout-Zelllinie (Δ Pals1-SMAP1). Für die Inaktivierung des SMAP1-Gens wurden die Konstrukte hSMAP1-CRISPR1 und hSMAP1-CRISPR2 verwendet (s. Abs. 3.8). DLD1 WT und DLD1 Δ Pals1 wurden in unterschiedlichen Ansätzen mit den Konstrukten

durch das Transfektionsreagenz Metafectene® transfiziert. Im Anschluss an die Puromycin-Selektion wurden zwölf Zellklone von DLD1 Δ SMAP1 (CR1: 9; CR2: 3) und 24 Zellklone von DLD1 Δ Pals1-SMAP1 (CR1:12; CR2:12) isoliert. Mit der primären Western Blot Analyse konnten acht DLD1 Δ SMAP1 (CR1: 5; CR2: 3) und 24 DLD1 Δ Pals1-SMAP1 (CR1:12; CR2:12) positive Knockout-Zellklone identifiziert werden. Für die Genotypisierung wurden die jeweiligen Zellklone entsprechend vorbereitet und anschließend in ein Fremdlabor eingeschickt (s. Abs. 4.2.5 bis 4.2.9). Nach Erhalt der Sequenzierungsdaten wurden folgende Knockout-Zelllinien ausgewählt:

Für die DLD1 Δ SMAP1-Zelllinie wurde Klon A4 mit einer Deletion von drei Basen (Tyrosin, Guanin, Guanin) ausgewählt (s. Abb. 12 A). Durch den Verlust der drei Basen kann die Aminosäure Tryptophan im Zuge der SMAP1-Translation nicht inkludiert werden. Klon E7 wurde für die DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinie verwendet, welcher mehrere Deletionen und Insertionen von Basen beinhaltet (s. Abb. 12 B). Der exemplarische Western Blot in Abbildung 12 C veranschaulicht die generierten DLD1 Δ SMAP1- und DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinien in Verbindung mit den Ursprungszelllinien. Es konnte auf Proteinebene in beiden SMAP1-Knockout-Zellen kein SMAP1-Signal gemessen werden.

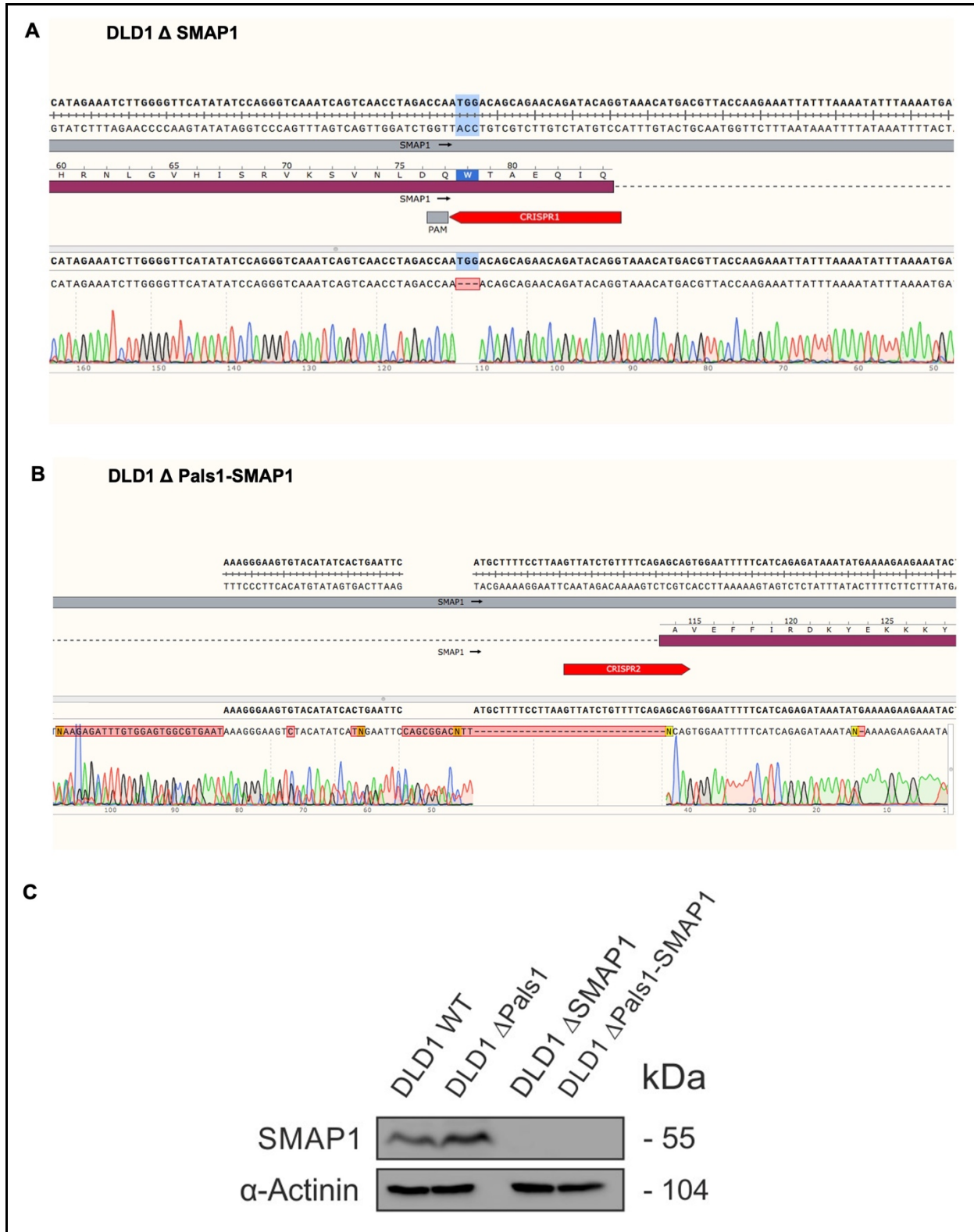


Abbildung 12: Sequenzierungsdaten und Western Blot Analyse der etablierten SMAP1-Knockout-Zelllinien

(A) DNA-Sequenz der generierten DLD1 Δ SMAP1-Zelllinie (Zellklon A4). Der Zellklon A4 zeigt eine Deletion von drei Basenpaaren (TGG). Diese Knockout-Zelllinie wurde vom hSMAP1-CRISPR1-Konstrukt editiert.

(B) Sequenzierungsdaten der etablierten DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinie (Zellklon E7). Der Zellklon E7 verfügt über Deletionen und Insertionen von mehreren Basenpaaren. Diese Knockout-Zelllinie wurde von dem hSMAP1-CRISPR2-Konstrukt editiert.

(C) Exemplarischer Western Blot, welcher die etablierten SMAP1-Knockout-Zelllinien in Zusammenhang mit den Ursprungszellen veranschaulicht. Es wurde ein SMAP1-Primärantikörper verwendet und α -Actinin wurde als Ladungskontrolle genutzt. Für die SDS-Page wurde ein 13,5 % iges Gel verwendet. Der Western Blot Versuch wurde einmalig durchgeführt.

4.4.2 Inaktivierung von Pals1 in SW48 WT, LoVo WT

Die SW48- und die LoVo-Kolonkarzinomzelllinie wurden ausgewählt, um weitere Pals1-Knockout-Zelllinien zu konstruieren, die analog zu der HCT116-Zelllinie über eine biallelische SMAP1-Mutation verfügen [94].

In Abbildung 13 A wird eine exemplarische Western Blot Analyse dargestellt, welche die SMAP1-Expression in den folgenden WT-Zelllinien analysiert: DLD1, Caco-2, RKO, SW48 und LoVo. Die Zellen wurden zuvor auf eine 10 cm Petrischale bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und mittels TNT-Puffer + Protease-Inhibitor lysiert (s. Abs. 4.1.5.1). Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der Zelllysate bestimmt und angleichend eingestellt (s. Abs. 4.4.1).

Das Zelllysate der DLD1-Zelllinie visualisiert die stärkste SMAP1-Expression, gefolgt von der Caco-2-Zelllinie. Allerdings besitzen Caco-2 und RKO ein verwandtes SMAP1-Signal, sodass die Diskrepanz zwischen DLD1- und den Caco-2-, RKO-Zellen am größten ist. Des Weiteren zeigt der Western Blot, dass in den SW48- und LoVo-Zelllinien kein SMAP1-Signal gemessen werden konnte.

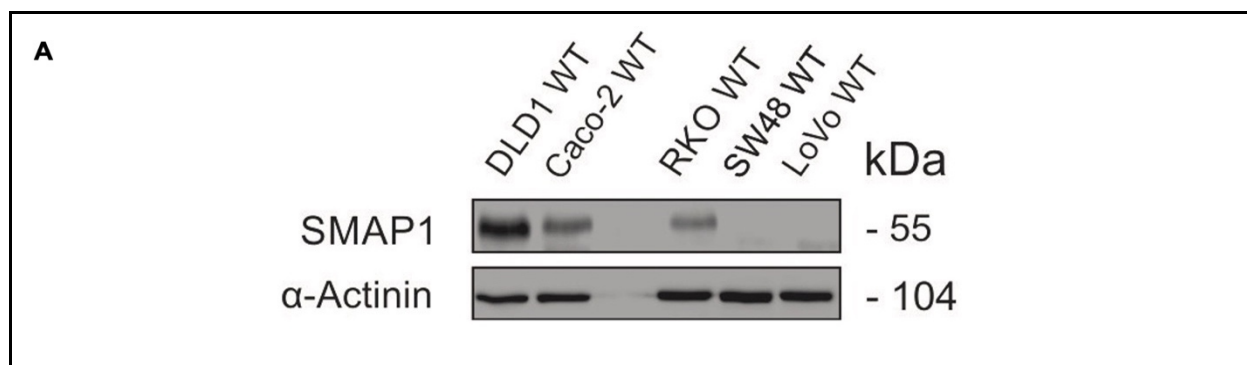


Abbildung 13: Vergleichende Western Blot Analyse von den folgenden WT-Zelllinien: DLD1, Caco-2, RKO, SW48, LoVo

(A) Repräsentativer Western Blot, der die SMAP1-Expression in den verschiedenen WT-Zelllinien darstellt. Es wurde ein Primärantikörper gegen SMAP1 verwendet und als Ladungskontrolle diente α -Actinin. Für die SDS-Page wurde ein 13,5 % iges Gel verwendet. Die Proteinkonzentration wurde bei den zu vergleichenden Zelllinien analog eingestellt, sodass alle Zelllysate den gleichen Proteinstatus besaßen. Der Western Blot Versuch wurde einmalig durchgeführt.

Für die Durchführung der CRISPR/Cas9-Methode bei den SW48- und den LoVo-Zellen wurde das Konstrukt hMPP5-CRISPR1 genutzt. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine™ 2000 verwendet, da sich die Zelllinien diffiziler transfizieren lassen. Im Anschluss an die Puromycin-Selektion waren zehn SW48- und drei LoVo-Zellklone angewachsen, die daraufhin isoliert und weiterkultiviert wurden. Im Anschluss an die primäre Western Blot Analyse erübrigten sich nur fünf mögliche SW48 Δ Pals1-Zellklone und lediglich ein potentieller LoVo Δ Pals1-Zellklon. Die Sequenzierungsergebnisse authentifizieren, dass sowohl ein SW48-Zellklon (Z3), als auch der einzige LoVo-Zellklon (A3) eine Pals1-Deletion aufweisen. Die Mutation betrifft bei den Knockout-Zelllinien das gleiche Adenin-Nukleotid, welches sich *upstream* der PAM-Sequenz befindet (s. Abb. 14 B). Abbildung 14 B zeigt einen exemplarischen Western Blot mit den Ursprungszelllinien und den abgeleitenden Pals1-Knockout-Zellen. Bei den WT-Zelllinien lassen sich die klassische Pals1-Doppelbanden identifizieren, während keine Pals1-Signale bei den Pals1-Knockout-Zellen zu lokalisieren sind. Zusammengefasst bestätigen die Sequenzierungsdaten und die Western Blot Analyse einvernehmlich, dass jeweils in der SW48- und in der LoVo-Zelllinie ein Pals1-Knockout generiert wurde.

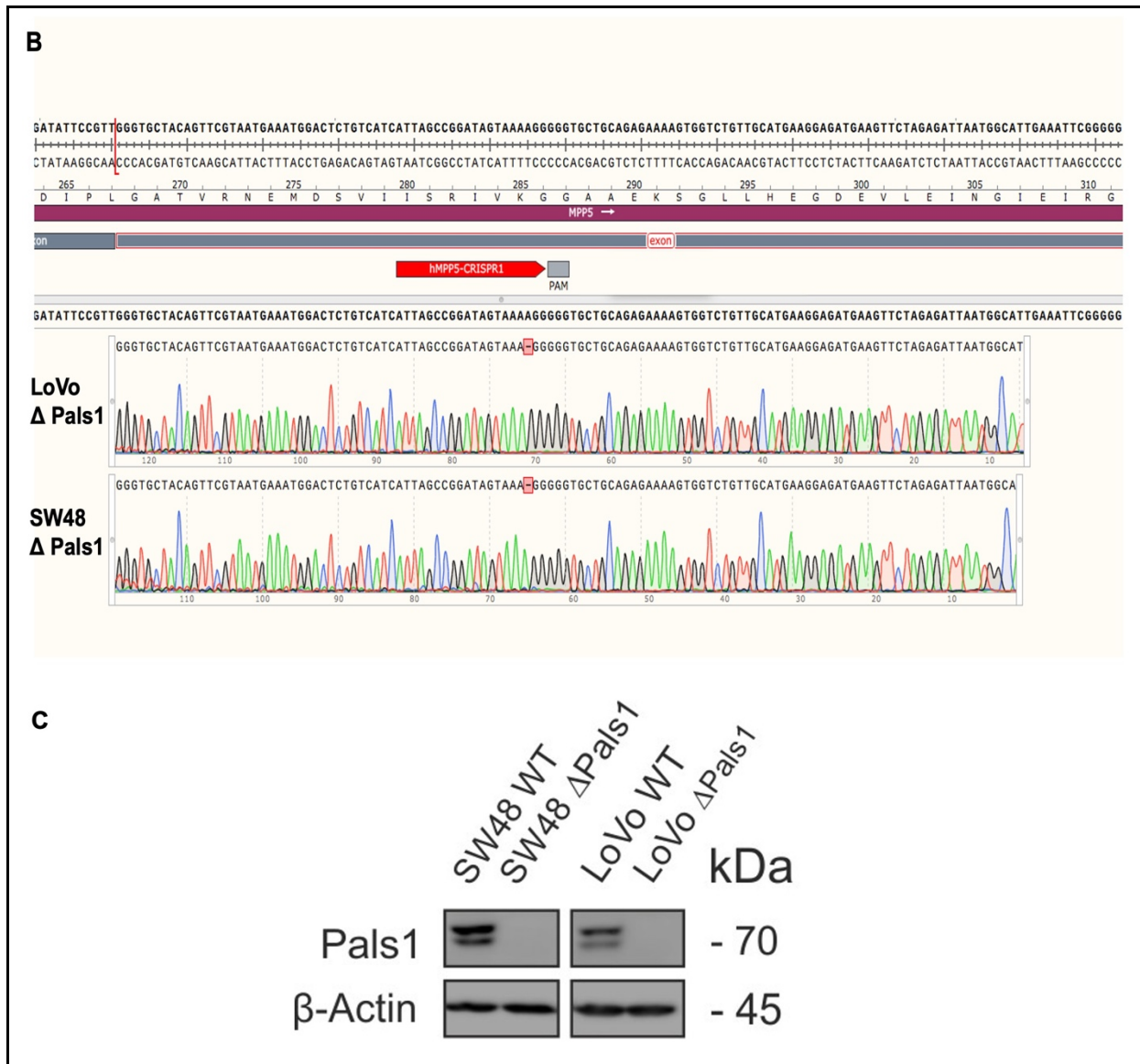


Abbildung 14: Sequenzierungsdaten und Western Blot Analyse der etablierten Pals1-Knockout-Zelllinien

(B) Sequenzierungsdaten der generierten LoVo Δ Pals1-Zelllinie (Zellklon A3) und SW48 Δ Pals1-Zelllinie (Zellklon Z3). Beide Zelllinien verfügen über eine Deletion der Adenin-Base *upstream* der PAM-Sequenz. Die Knockout-Zelllinien wurden von dem hMPP5-CRISPR1-Konstrukt editiert.

(C) Repräsentativer Western Blot, der die WT-Zelllinien mit den entsprechenden Pals1-Knockout-Zellen visualisiert. Der Western Blot wurde mit einem Primärantikörper gegen Pals1 durchgeführt und als Ladungskontrolle wurde β -Actin verwendet. Für die SDS-Page wurde ein 10 %iges Gel genutzt. Der Western Blot Versuch wurde einmalig durchgeführt.

4.5 Untersuchung der etablierten DLD1-Knockout-Derivate

Um die Bedeutung einer gleichzeitigen Pals1- und SMAP1-Deletion in den DLD1-Zellen zu verifizieren, wurden Migrations- und Invasionsversuche und gleichermaßen Rac1 und Arf6 Pulldown-Assays durchgeführt, welche in diesem Abschnitt dargestellt werden. Die unterschiedlichen Experimente der DLD1 Δ SMAP1- und DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinien wurden in Anlehnung mit den Ursprungszelllinien (DLD1 WT/ DLD1 Δ Pals1) durchgeführt.

4.5.1 Analyse der Migrations- und Invasionsbereitschaft

Der Migrationsversuch der DLD1 WT-, DLD1 Δ Pals1-, DLD1 Δ SMAP1- und DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinie wird in Abbildung 15 A und B veranschaulicht. Für die Charakterisierung der Zellmigrationskapazität wurden mikroskopische Bilder zum Zeitpunkt 0 und nach 13,5 h angefertigt. Die Zeitangabe ist assoziiert mit der Zeitspanne aus dem Versuch 5.2.1, bei dem lediglich die DLD1 WT- mit der entsprechenden Pals1-Knockout-Zelllinie verglichen wurde. In Abbildung 15 A werden Auszüge aus den mikroskopischen Aufnahmen des Migrationsversuches dargestellt. Die DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinie verfügt über die Fähigkeit den Spaltraum innerhalb der 13,5 h vollständig zu schließen und stellt dadurch eine konfluente Monoschicht wieder her. Währenddessen ist die Migrationsbereitschaft bei den anderen DLD1-Varianten wesentlich geringer ausgeprägt, sodass auch nach 13,5 h ein gewisser Spaltraum demarkiert werden kann. In der quantitativ amplifizierte Darstellung wird deutlich, dass die DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinie, im Gegensatz zu den anderen DLD1-Zelllinien, eine signifikant höhere Zellmigration aufweist (s. Abb. 15 B).

Bei dem Invasionsassay wurden die DLD1-Varianten für 56 h mit 10 % versetztem FCS-Medium im Wärmeschrank inkubiert. Die visuellen Aufnahmen in Abbildung 15 D verdeutlichen die erhebliche Divergenz zwischen der Doppel-Deletionsmutante und den anderen DLD1-Zelllinien. In der quantifizierten Grafik wurde die Invasionskapazität der WT-Zelllinie auf 100 % normiert (s. Abb. 15 C). Die DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinie verfügt konträr dazu über eine weitaus höhere Invasionsfähigkeit, die bei circa 130 % liegt. DLD1 Δ Pals1 und DLD1 Δ SMAP1 besitzen hingegen eine Invasionsmotivation, die lediglich bei circa 90 % liegt.

Resümierend illustrieren die Versuche, dass der simultane Verlust von Pals1 und SMAP1 in den DLD1 in eine erhöhte Zellmigration und Zellinvasion resultiert.

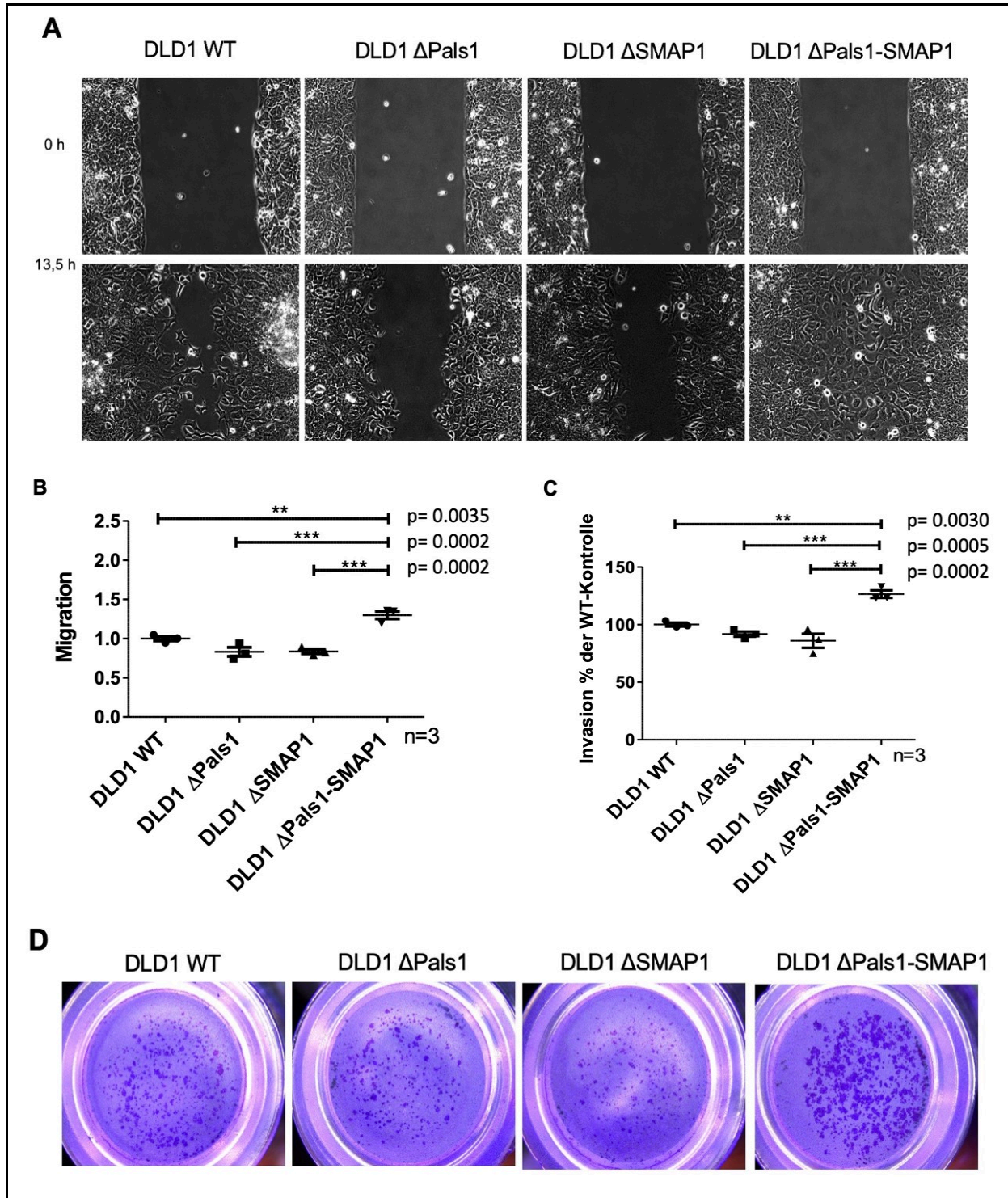


Abbildung 15: Migrationsassay und Invasionsassay der verschiedenen DLD1-Varianten

(A, B) Mikroskopische Aufnahmen (s. Abb. 15 A) und quantitative Amplifikation des Migrationsassays (s. Abb. 15 B). Für den Versuch wurden 50.000 Zellen ausgesät und Aufnahmen zum Zeitpunkt 0 und

nach 13,5 h angefertigt. Mithilfe der mikroskopischen Aufnahmen wurde die Migrationsgeschwindigkeit in μm und in Echtzeit mit der Computersoftware ImageJ berechnet. Die graphische Darstellung der Migrationsfähigkeit erfolgte durch die Normierung der WT-Zelllinie auf den Wert eins. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Signifikanzen zwischen der DLD1 $\Delta\text{Pals1-SMAP1}$ -Zelllinie und den anderen DLD1-Varianten werden detailliert an der rechten Seite aufgeführt und werden mit dem Signifikanzniveau * $<0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$ angegeben. Die DLD1 WT und DLD1 $\Delta\text{Pals1-}$ und $\Delta\text{SMAP1-Derivate}$ weisen untereinander keine signifikanten Migrationsdivergenzen auf.

(C, D) Graphische Darstellung des Invasionsassays (s. Abb. 15 C) und visuelle Präsentation der angefärbten Zellkultureinsätze (s. Abb. 15 D). Es wurden 500.000 Zellen in den Zellkultureinsätzen ausgesät und für 56 h inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch die Normierung der Invasionskapazität der WT-Zelllinie auf 100 %. Der Assay wurde dreimal unabhängig voneinander ausgeführt. Die Signifikanzen zwischen DLD1 $\Delta\text{Pals1-SMAP1}$ und den zu parallelisierenden Zelllinien werden detailliert an der rechten Seite aufgeführt und werden mit dem Signifikanzniveau * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$ angegeben. DLD1 WT und die DLD1 $\Delta\text{Pals1-}$ und $\Delta\text{SMAP1-Derivate}$ weisen untereinander keine signifikanten Invasionsunterschiede auf.

4.5.2 Einfluss von Rac1 und Arf6 unter Verwendung des GST-Pulldown-Assays

In Anbetracht der Ergebnisse aus 4.5.1. kann die Frage formuliert werden, ob die erhöhte Zellmotilität gleichermaßen mit einem hochregulierten aktiven Rac1- und Arf6-Level zusammenhängt.

Für den Rac1 und Arf6 GST-Pulldown-Assay wurden die Zellen auf eine 10 cm Petrischale bis zur Zielkonfluenz von 100 % kultiviert, mit TNT-Puffer + Protease-Inhibitor lysiert (s. Abs. 4.1.5.1) und zudem mithilfe der Bradford-Methode auf eine analoge Proteinkonzentration angepasst (s. Abs. 4.4.1).

In Abbildung 16 A wird ein exemplarischer Western Blot veranschaulicht, welcher zum einen das totale Rac1-Level (*Input*, obere Spur) und zum anderen das aktive Rac1-Level (mittlere Spur) visualisiert. Die densitometrische Quantifizierung des Proteinsignals wird in Abbildung 16 B und C dargestellt und reflektiert das relative Verhältnis von totalem Rac1 und aktivem Rac1 aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die totale Rac1-Expression weist keine Diskrepanz zwischen den verschiedenen Zelllinien auf. In Hinblick auf das aktive Rac1-Level besitzen die WT-Zelllinie und die $\Delta\text{Pals1-}$ und $\Delta\text{SMAP1-Derivate}$ nur ein geringfügiges, aktives Signal, sodass bei der amplifizierte Grafik nur eine unerhebliche Abweichung zwischen den Zelllinien besteht (s. Abb. 16 C). Demgegenüber präsentiert die Doppel-Deletionsmutante eine bedeutsame Hochregulation der aktiven Rac1-Expression, die bis zum Sechsfachen kontrastiv zu der WT-Zelllinie reicht (s. Abb. 16 C).

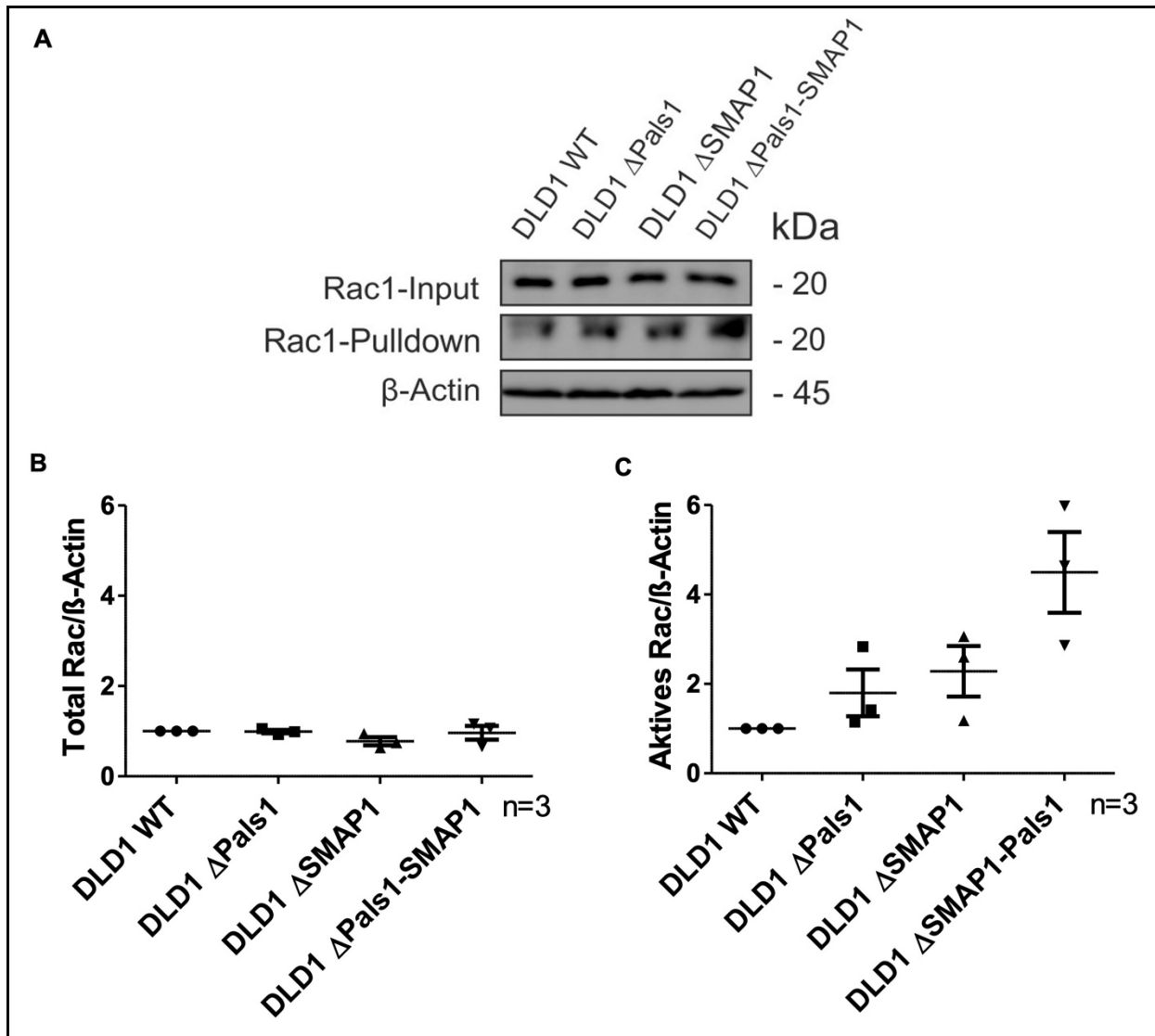


Abbildung 16: Nachweis des totalen und aktiven Rac1-Levels via GST-Pulldown-Assay bei DLD1 WT/ Δ Pals1/ Δ SMAP1/ Δ Pals1-SMAP1

(A) Unter Verwendung einer Western Blot Analyse wurde das totale Rac1 (obere Spur) und das aktive Rac1 (mittlere Spur) in den verschiedenen DLD1-Varianten untersucht. Als Primärantikörper wurde ein panRac-Antikörper verwendet und als Ladekontrolle wurde β -Actin genutzt. Für die SDS-Page wurde ein 13,5 % iges Gel ausgewählt.

(B, C) Anhand einer densitometrischen Analyse wurde die Rac1-Intensität quantitativ amplifiziert. Dargestellt wird zum einen das totale Rac1-Level (s. Abb. 16 B) und zum anderen das aktive Rac1-Level (s. Abb. 16 C). Die Rac1-Expression wurde auf β -Actin rekurriert. Das relative Rac1-Verhältnis der WT-Zelllinie wurde auf den Wert eins normiert, damit eine unmittelbare Abweichung der CRISPR/Cas9-Mutanten reflektiert werden kann. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Der Arf6 GST-Pulldown-Assay wird durch einen exemplarischen Western Blot (s. Abb. 17 A) und einer densitometrischen Amplifikation des totalen und aktiven Arf6-Levels veranschaulicht (s. Abb. 17 B, C). Im Hinblick auf das Arf6-Gesamtprotein präsentiert die DLD1 Doppel-Deletionsmutante bezogen auf die WT-Kontrolle bereits eine Überexpression um das Dreifache (s. Abb. 17 B). Darüber hinaus visualisiert Abbildung 17 B, dass die DLD1 Δ Pals1- und DLD1 Δ SMAP1-Zelllinie konträr zur WT-Zelllinie ein dezent erhöhtes totales Arf6-Level besitzen (circa 1,5-fach). Jedoch fällt dieser minimale Anstieg, im Vergleich zu der erheblichen totalen Arf6-Expression der DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinie, nicht ins Gewicht.

Des Weiteren illustriert Abbildung 17 C, dass die Doppel-Mutante obendrein, im Vergleich zur WT-Zelllinie, über ein circa zweifach erhöhtes, aktives Arf6-Protein verfügt. Des Weiteren zeigen Abbildung 17 A und C, dass DLD1 Δ Pals1 und DLD1 Δ SMAP1, im Kontrast zur WT-Zelllinie, ein geringfügig aktives Arf6-Level besitzen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinie sowohl ein erhöhtes Arf6-Gesamtprotein als auch ein exorbitant überexprimiertes, aktives Arf6-Level aufweist.

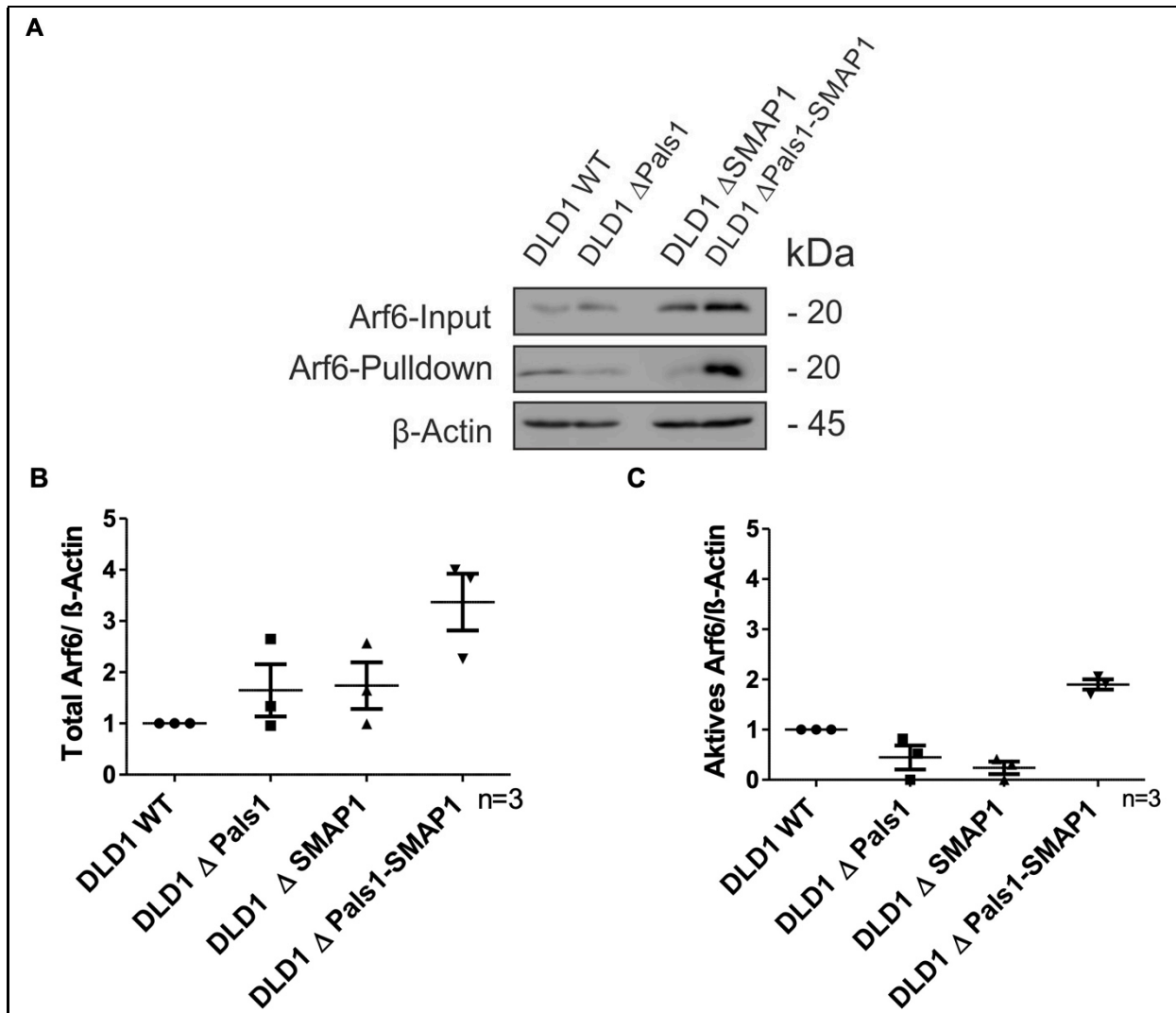


Abbildung 17: Nachweis des totalen und aktiven Arf6-Niveaus via GST-Pulldown-Assay bei DLD1 WT/ Δ Pals1/ Δ SMAP1/ Δ Pals1-SMAP1

(A) Repräsentative Western Blot Analyse, welche mit einem Arf6-Primärantikörper durchgeführt wurde. Dargestellt wird zum einen das totale Arf6-Level (obere Spur) und zum anderen das aktive Arf6 Level (mittlere Spur). Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet. Für die SDS-Page wurde ein 13,5 % iges Gel ausgewählt.

(B, C) Graphische Darstellung der densitometrischen Quantifizierung der Arf6-Intensität. Visualisiert wird das Arf6-Gesamtprotein (s. Abb. 17 B) und die Arf6-Expression im Aktivitätszustand (s. Abb. 17 C). Die Arf6-Expression wurde auf die Ladekontrolle standardisiert und das relative Arf6-Verhältnis der WT-Zelllinie wurde auf den Wert eins normiert. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

4.6 Charakterisierung der generierten SW48 Pals1-Knockout-Zelllinie

In diesem Abschnitt werden die Migrations- und Invasionsversuche der SW48 WT- und der generierten SW48 Δ Pals1-Zelllinie (s. Abs. 5.4.2) veranschaulicht. Im Anschluss der Zellmotilitätsversuche wurden zusätzlich Rac1 und Arf6 GST-Pulldown-Assays durchgeführt, um die Bedeutung von Rac1 und Arf6 in diesem Zusammenhang zu validieren.

4.6.1 Analyse der Migrations- und Invasionsbereitschaft

In Abbildung 18 A und B wird der Migrationsassay der SW48 WT-Zelllinie und der ableitenden Δ Pals1-Zelllinie dargestellt. Für den Migrationsversuch wurden die konfluenten Zellen insgesamt 72 h inkubiert. Die mikroskopischen Aufnahmen des Migrationsversuches visualisieren, dass die WT-Zellen über eine unzureichende Migrationsfähigkeit verfügen, sodass der Spaltraum nur unwesentlich reduziert wurde (s. Abb. 18 A). Demgegenüber präsentiert die SW48 Δ Pals1-Zelllinie eine eklatant verstärkte Migrationsbereitschaft, sodass nach 72 h eine Rekonvaleszenz des Spaltraumes erreicht wurde (s. Abb. 18 A). In Abbildung 18 B ist zu erkennen, dass die SW48 Knockout-Zelllinie eine nahezu duplizierte Migrationsgeschwindigkeit konträr zur WT-Zelllinie aufweist. Mit einer Signifikanz von $p=0,0088$ verfügt der Pals1-Knockout über eine höhere Migrationskapazität.

Der Invasionsversuch wird der SW48-Zelllinien in Abbildung 18 C und D präsentiert. Bei der Durchführung des Invasionsassays wurde eine erhöhte FCS-Konzentration gewählt (20 %) und die Zellen wurden für 120 h in den Zellkultureinsätzen inkubiert. In Abbildung 18 C werden die Übersichtsaufnahmen der angefärbten Zellkultureinsätze veranschaulicht. Die Auszüge illustrieren, dass nur eine marginale Zellmenge auf der Unterseite der Zellkultureinsätze adhärirten. Abbildung 18 D stellt die Quantifizierung der verifizierbaren Zellen dar, welche aufzeigt, dass keine signifikante Differenz zwischen der SW48 WT-Zelllinie und dem Pals1-Knockout besteht.

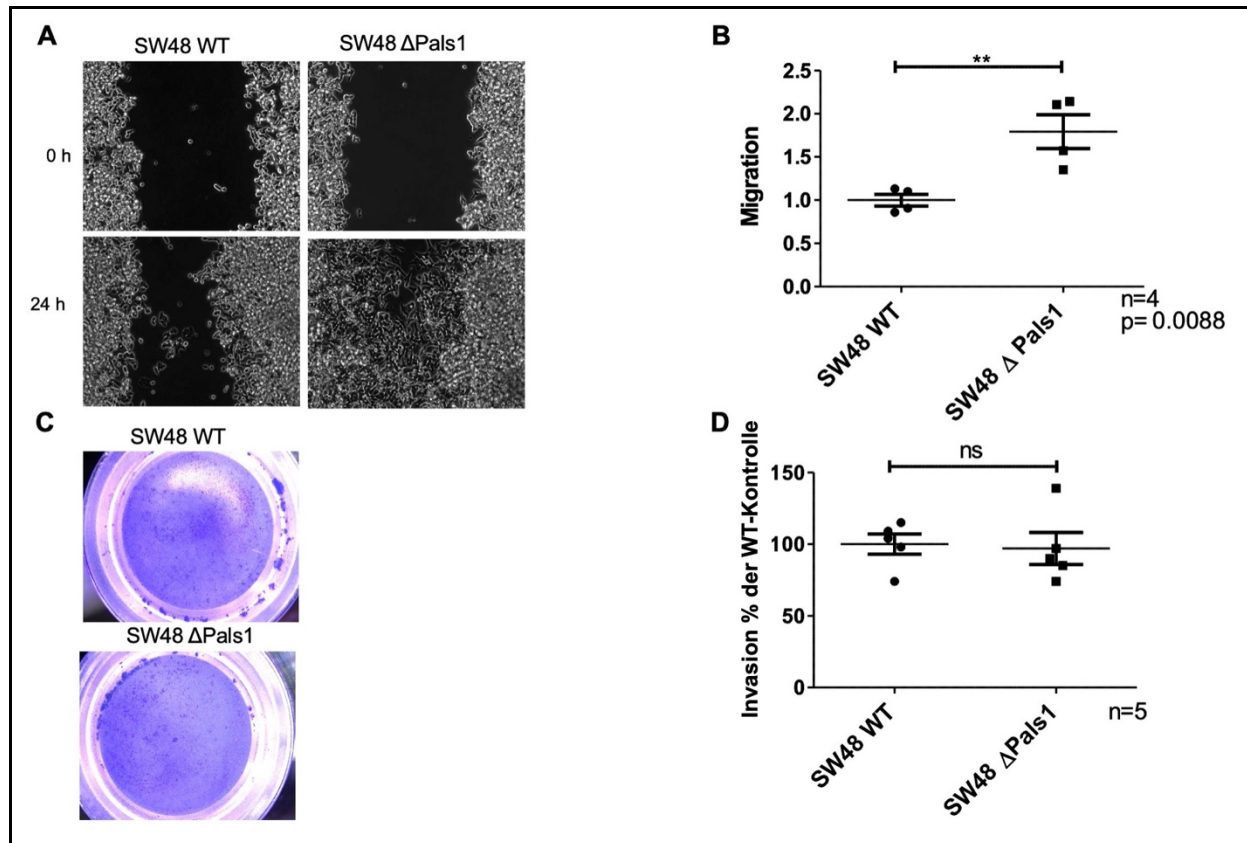


Abbildung 18: Migrationsassay und Invasionsassay von SW48 WT/ SW48 ΔPals1

(A, B) Mikroskopische Aufnahmen (s. Abb. 18 A) und graphische Aufführung des Migrationsassays (s. Abb. 18 B). Für jeden Versuch wurden 150.000 Zellen pro Well des culture-inserts ausgesät und die mikroskopischen Aufnahmen wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 72 h angefertigt. Mithilfe der Computersoftware ImageJ wurde anhand der mikroskopischen Bilder die Zellmigration in μm und in Echtzeit berechnet. Die graphische Darstellung der Zellmigration erfolgte durch die Normierung der WT-Zelllinie auf den Wert eins. Der Versuch wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Signifikanz wird mit dem folgendem Signifikanzniveau * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001 aufgeführt.

(C, D) Optische Demonstration der mit Kristallviolett angefärbten Zellkultureinsätze (s. Abb. 18 C) und graphische Quantifizierung des Invasionsassays (s. Abb. 18 D). Es wurden 500.00 Zellen in den Zellkultureinsätzen ausgesät und für 120 h inkubiert. Als *Chemoattractant* wurde mit 20 % versetztes FCS gewählt. Die Auswertung erfolgte durch die Normierung der Invasionskapazität der WT-Zelllinie auf 100 %. Der Assay wurde fünfmal unabhängig voneinander durchgeführt.

4.6.2 Einfluss von Rac1 und Arf6 unter Verwendung des GST-Pulldown-Assays

Um den Einfluss der kleinen GTPasen Rac1 und Arf6 auf die Zellmigration zu eruieren, wurden GST-Pulldown-Assays durchgeführt. Für den Rac1 und Arf6 GST-Pulldown-Assay wurden die SW48-Zelllinien auf eine 10 cm Petrischale bis zur Zielkonfluenz von 100 % kultiviert, mit TNT-Puffer + Protease-Inhibitor lysiert (s. Abs. 4.1.5.1) und anschließend wurden die Zellysate auf eine identische Proteinkonzentration assimiliert (s. Abs. 4.4.1).

Der Rac1 Pulldown-Assay wird visualisiert, als repräsentativer Western Blot in Abbildung 19 A und als quantifiziertes Diagramm in Abbildung 19 B und C. Im Hinblick auf das totale Rac1-Level weisen die Zelllinien keine ausgeprägte Differenz auf (s. Abb. 19 A und B). Im Kontrast dazu veranschaulicht der exemplarische Western Blot in Abbildung 19 A, dass die Delektionsmutante über eine exorbitant verstärkte Rac1-Expression im Aktivitätszustand verfügt. Demgegenüber besitzt die WT-Zelllinie nur ein geringfügig messbares aktives Proteinsignal (s. Abb. 19 A). In Abbildung 19 C wird diese Divergenz unter Verwendung der densitometrischen Quantifizierung manifestiert, indem das aktive Rac1-Level bei SW48 Δ Pals1-Zelllinie um das 2,7-fache ansteigt.

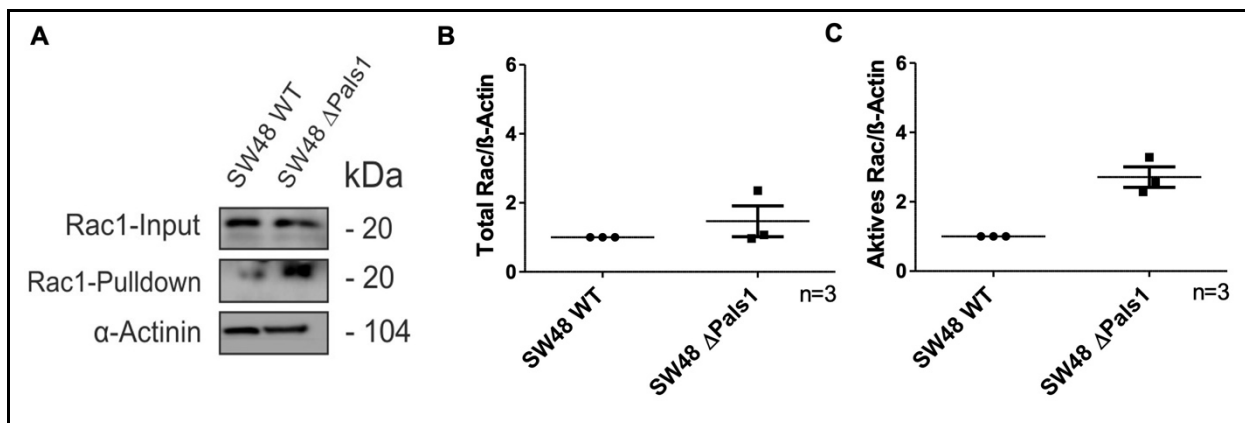


Abbildung 19: Nachweis des totalen und aktiven Rac1-Level via GST-Pulldown-Assay bei SW48 WT/ SW48 Δ Pals1

(A) Exemplarische Western Blot Analyse, bei der das Rac1-Gesamtprotein (obere Spur) und das aktive Rac1-Protein (mittlere Spur) in den SW48-Zellen analysiert wurde. Als Primärantikörper wurde ein panRac-Antikörper verwendet und als Ladekontrolle wurde β -Actin genutzt. Für die SDS-Page wurde ein 13,5 % iges Gel ausgewählt.

(B, C) Graphische Demonstration des totalen Rac1-Level (s. Abb. 19 B) und des aktiven Rac1-Level (s. Abb. 19 C). Mithilfe einer densitometrischen Quantifizierung konnte das Rac1-Signal eruiert werden

und die Rac1-Expression wurde auf β -Actin normiert. Das relative Rac1-Verhältnis der WT-Zelllinie wurde auf den Wert eins normiert, damit eine unmittelbare Abweichung der CRISPR/Cas9-Mutante reproduziert werden kann. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Im Folgenden wird in Abbildung 20 der Arf6 GST-Pulldown-Assay dargelegt, welcher aufzeigt, dass eine beachtliche Hochregulation des aktiven Arf6-Proteins in den SW48 Δ Pals1-Zellen betrachtet werden kann (s. Abb. 20 A und C). In Abbildung 20 C ist eine Arf6-Überexpression um das 3,3-fache in Bezug auf die WT-Kontrolle zu sehen. Demgegenüber präsentiert das Arf6-Gesamtprotein ein kongruentes Expressionsniveau im Vergleich zwischen der WT-Zelllinie und der Knockout-Mutante (s. Abb. 20 A und B).

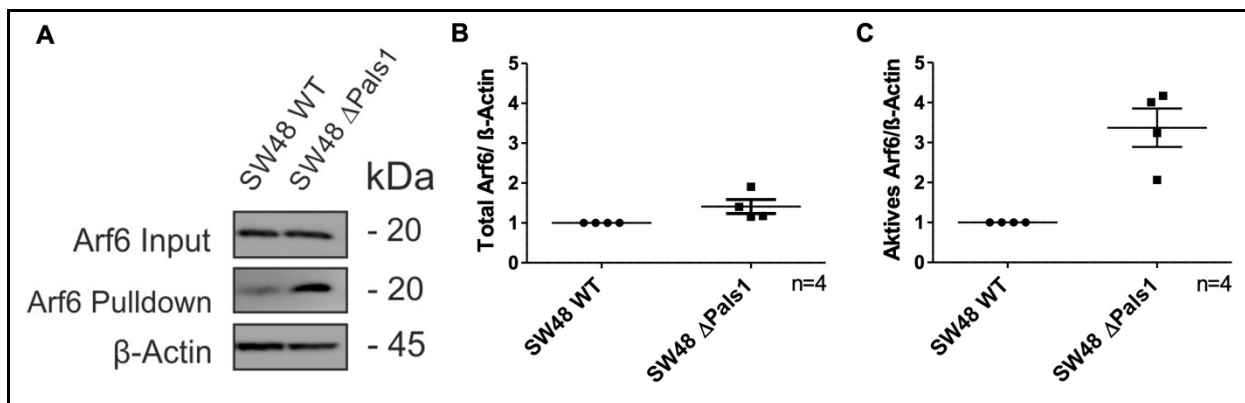


Abbildung 20: Nachweis des totalen und aktiven Arf6-Llevels via GST-Pulldown-Assay bei SW48 WT/ SW48 Δ Pals1

(A) Repräsentative Western Blot Analyse der SW48-Zellen. Es wurde ein Arf6-Primärantikörper verwendet, der zum einen das Arf6-Gesamtprotein (obere Spur) und zum anderen das aktive Arf6-Level (mittlere Spur) detektierte. Als Ladekontrolle wurde β -Actin genutzt. Für die SDS-Page wurde ein 13,5 % iges Gel ausgewählt.

(B, C) Densitometrische Quantifizierung der Arf6-Intensität veranschaulicht in einem Punkte-Diagramm. Dargestellt wird das totale Arf6-Protein (s. Abb. 20 B) und die Arf6-Expression im Aktivitätszustand (s. Abb. 20 C). Die Arf6 Expression wurde in Bezug auf β -Actin standardisiert und das relative Arf6-Verhältnis der WT-Zelllinie auf den Wert eins normiert. Der Versuch wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt.

4.7 Charakterisierung der generierten LoVo Pals1-Knockout-Zelllinie

In diesem Abschnitt wurde die LoVo Δ Pals1-Zelllinie in Anlehnung mit ihrer Ursprungszelllinie auf ihre Migrations- und Invasionsfähigkeit charakterisiert, um die Malignität dieser Pals1-Knockout-Zelllinie zu eruieren.

4.7.1 Analyse der Migrations- und Invasionsbereitschaft

Der Migrationsassay der LoVo WT- und LoVo Δ Pals1-Zelllinie wird in Abbildung 21 A und B dargestellt. Für den Migrationsversuch wurden die mikroskopischen Aufnahmen der konfluenten Monozellschicht zum Zeitpunkt 0 und nach 24 stündiger Inkubationszeit im Wärmeschrank angefertigt. Aus den Auszügen der mikroskopischen Bilder ist zu erkennen, dass die LoVo WT-Zelllinie eine moderate Migrationsbereitschaft demonstriert, während die Deletionsmutante nahezu ein Unvermögen besitzt, in den Spaltraum zu migrieren (s. Abb. 21 A). Der WT-Zelllinie kann aus Abbildung 21 B eine einfach-signifikant erhöhte Migrationsgeschwindigkeit attribuiert werden, im Vergleich zu der LoVo Δ Pals1-Zelllinie.

Das Invasionsexperiment wird in Abbildung 21 C und D visualisiert. Bei dem Invasionsassay betrug der Kultivierungszeitraum 72 h und als *Chemoattractant* wurde ein Medium verwendet, welches mit 10 % FCS versetzt war. Die Abbildung 21 D veranschaulicht, dass die LoVo WT-Zelllinie eine augenscheinlich verstärkte Invasionskapazität besitzt, die allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung nicht als signifikant deklariert werden kann. Die Übersichtsaufnahmen der Zellkultureinsätze in Abbildung 21 C zeigen zudem, dass keine erhebliche Invasionsdivergenz zwischen der Ursprungszelllinie und der Deletionsmutante besteht. Abschließend ist festzuhalten, dass die LoVo Δ Pals1-Zelllinie über keine erhöhte Fähigkeit zur Zellmigration und -invasion verfügt.

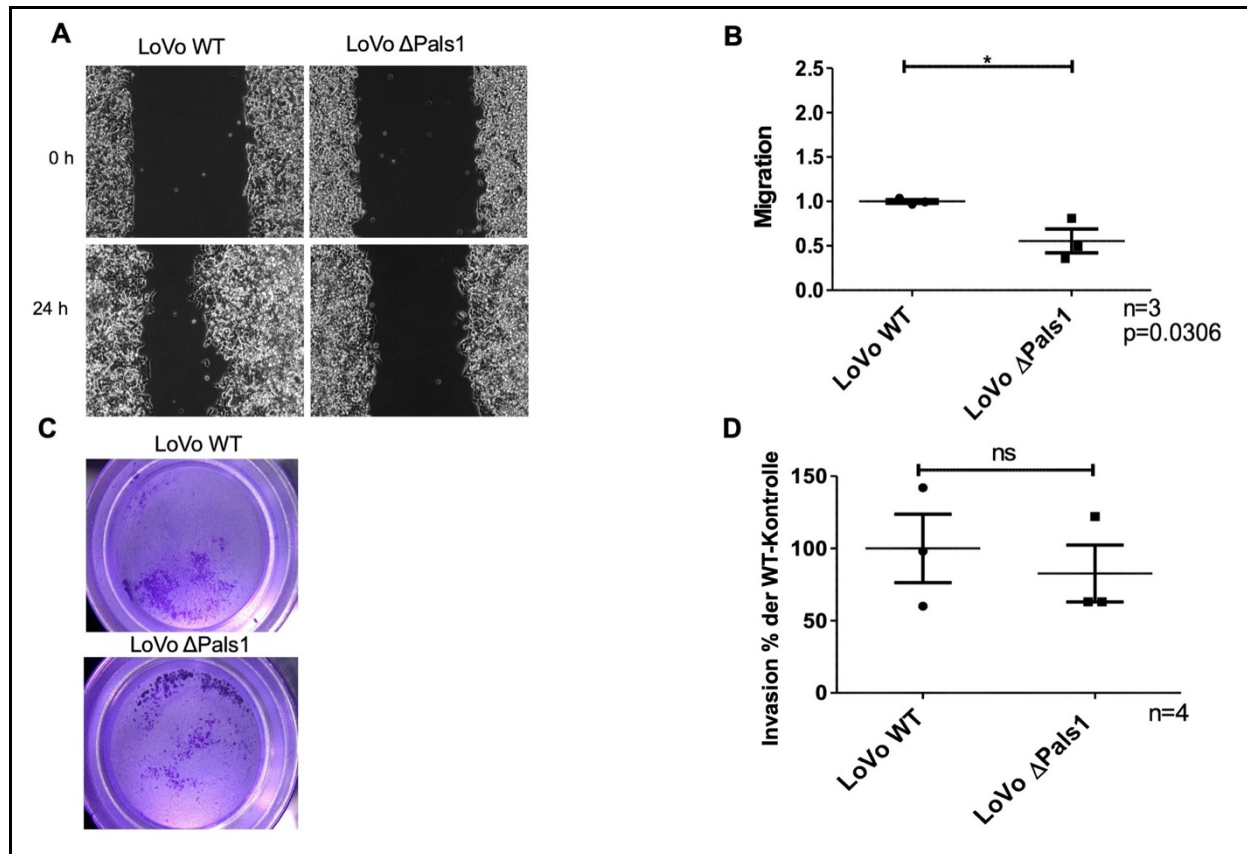


Abbildung 21: Migrationsassay und Invasionsassay von LoVo WT/ LoVo Δ Pals1

(A,B) Mikroskopische Aufnahmen (s. Abb. 21 A) und graphisches Quantifizierung des Migrationsassays (s. Abb. 21 B). Für jeden Versuch wurden 150.000 Zellen ausgesät und die mikroskopischen Bilder wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 24 h angefertigt. Die Migrationsgeschwindigkeit wurde anhand der mikroskopischen Aufnahmen mithilfe der Computersoftware ImageJ in μm und in Echtzeit berechnet. Die quantifizierte Darstellung der Zellmigration erfolgte durch die Normierung der WT-Zelllinie auf den Wert eins. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Signifikanz wird mit dem folgendem Signifikanzniveau $* < 0,05$; $** < 0,01$; $*** < 0,001$ angegeben.

(C,D) Übersichtsaufnahmen der Zellkultureinsätze (s. Abb. 21 C) und quantitative Auswertung des Invasionsassays (s. Abb. 21 D). Es wurden 500.000 Zellen in den Zellkultureinsätzen ausgesät, für 72 h kultiviert und als *Chemoattractant* wurde Medium verwendet, welches mit 10 % FCS versetzt war. Die Auswertung erfolgte durch die Normierung der Invasionskapazität der WT-Zelllinie auf 100 %. Der Assay wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt.

4.8 Untersuchung der Pals1-Präsenz in den polymorphen Kolonkarzinomzelllinien

4.8.1 Analyse der Pals1-Expression in den DLD1-, RKO-, Caco-2-, SW48- und LoVo-Krebszellen

Die Durchführung einer Western Blot Analyse wurde vollzogen, um die primäre Anwesenheit von Pals1 in den Kolonkarzinomzelllinien, die für diese Arbeit verwendet wurden, zu validieren. Diese Analyse wurde mit Zelllysaten durchgeführt, die auf 100 % konfluenten 10 cm Petrischalen kultiviert und unter Verwendung von TNT-Puffer + Protease-Inhibitor lysiert wurden (s. Abs. 4.1.5.1). Im Anschluss konnte anhand der Bradford-Messung die Proteinkonzentration der Zelllysate analog eingestellt werden (s. Abs. 4.4.1).

Neben den WT-Zelllinien wurden auch die korrespondierenden Pals1-Knockout-Mutanten für die Veranschaulichung der abwesenden Pals1-Doppelbanden, aufgetragen (s. Abb. 22 A). Der exemplarische Western Blot Auszug illustriert, dass alle Kolonkarzinomzelllinien über eine moderate, aber unterschiedliche Pals1-Expression verfügen und dass keinerlei Pals1-Signal bei den Knockout-Zellen zu lokalisieren ist (s. Abb. 22 A). Die densitometrische Quantifizierung der Pals1-Intensität wird in Abbildung 22 B dargestellt, wo das relative Pals1-Verhältnis auf die DLD1 WT-Zelllinie aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen normalisiert wurde. DLD1 WT und RKO WT weisen ein äquivalentes Pals1-Level auf, während die LoVo-Zellen ein geringfügig erhöhtes Pals1-Level besitzen (circa Zweifacher Anstieg). Konträr zu der DLD1 WT-Zelllinie verfügen die Caco-2 WT-Zellen mit einem knapp dreifachen und die SW48 WT-Zellen mit einem circa Vierfachen Anstieg der Pals1-Expression über eine evident erhöhte Pals1-Expression.

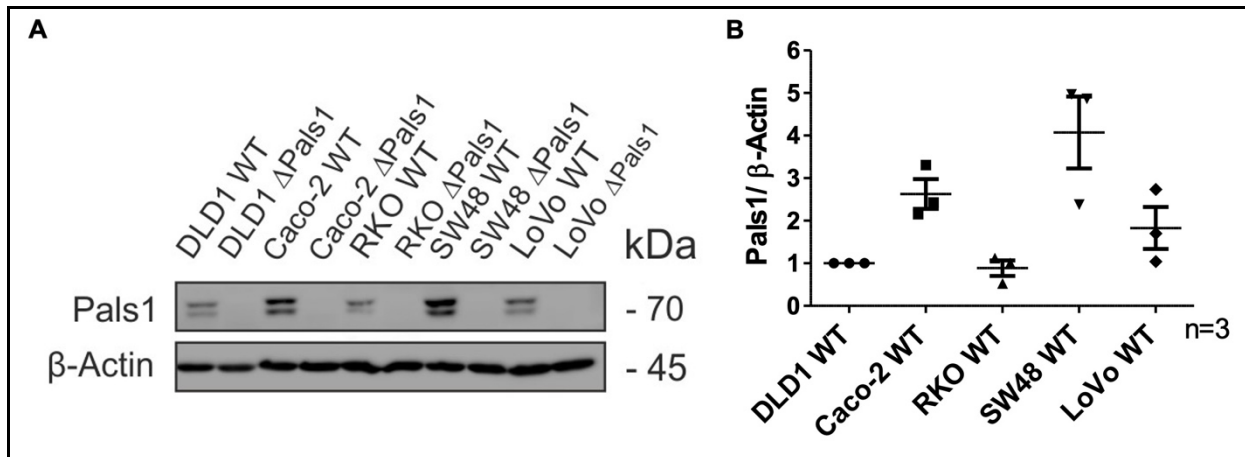


Abbildung 22: Vergleichende Western Blot Analyse zur Analyse der Pals1-Expression in DLD1, Caco-2, RKO, SW48 und LoVo

(A) Repräsentativer Western Blot durchgeführt mit einem Primärantikörper gegen Pals1, um eine unterschiedliche Proteinexpression zu eruieren. Als Ladungskontrolle wurde β -Actin genutzt. Für die SDS-Page wurde ein 13,5 % iges Gel verwendet.

(B) Densitometrische Quantifizierung der Pals1-Intensität, die in Bezug auf β -Actin normiert wurde. Das relative Pals1-Verhältnis wurde auf die DLD1 WT-Zelllinie und auf den Wert eins normiert. Der Western Blot wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

4.8.2 Evaluierung der Pals1-Expression in DLD1 Δ SMAP1

In diesem Abschnitt richtet sich die Aufmerksamkeit auf die Pals1-Expression von der DLD1 Δ SMAP1-Zelllinie. Unter Verwendung einer Western Blot Analyse soll ermittelt werden, ob der SMAP1-Verlust in den DLD1 dazu führt, dass im Gegenzug das Pals1-Protein hochreguliert ist. Die Zellen wurden für den Versuch auf 10 cm Petrischalen bis zu einer Zielkonfluenz von 100 % kultiviert, mit TNT-Puffer + Protease-Inhibitor lysiert (s. Abs. 4.1.5.1) und anschließend anhand der Bradford-Messung auf ein identisches Proteinlevel angepasst (s. Abs. 4.4.1).

Der exemplarische Western Blot in Abbildung 23 A visualisiert, dass die DLD1 WT- und die SMAP1-Knockout-Zelllinie über konforme Pals1-Doppelbanden verfügen. Dieser Western Blot Auszug wird durch die quantitative Amplifikation aus fünf Versuchen validiert. Dargestellt werden in Abbildung 23 B äquivalent relative Pals1-Verhältnisse der DLD1 WT- und DLD1 Δ SMAP1-Zelllinie.

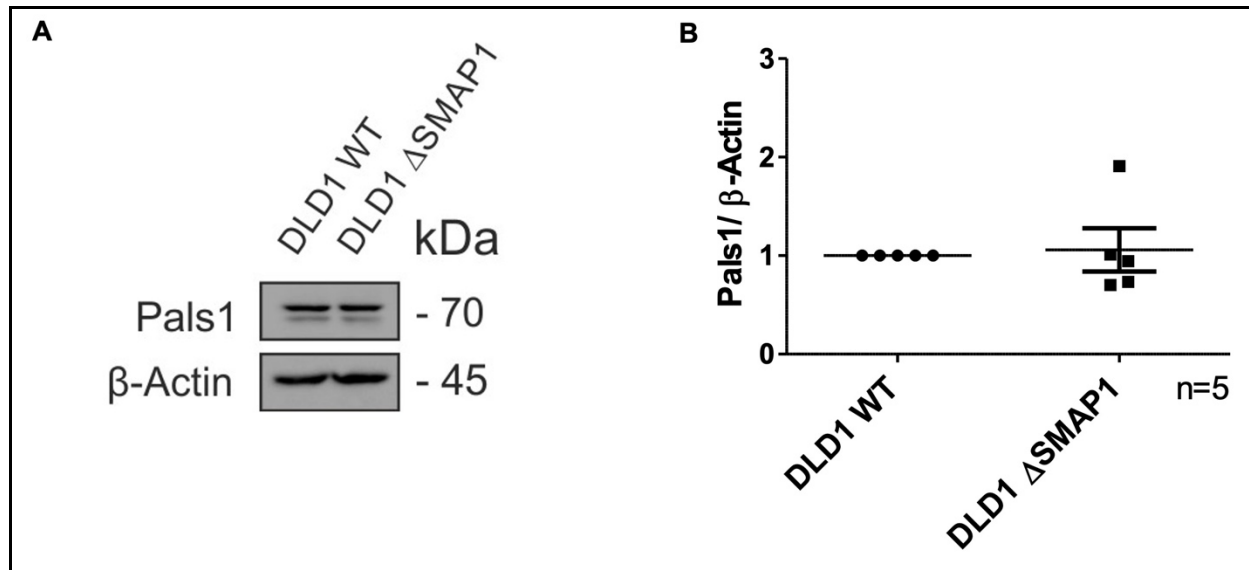


Abbildung 23: Vergleichende Western Blot Analyse zur Analyse der Pals1-Expression in DLD1 WT/ DLD1 Δ SMAP1

(A) Exemplarische Western Blot Analyse, welche mit einem Pals1-Primärantikörper durchgeführt wurde. Als Ladungskontrolle wurde β -Actin genutzt. Für die SDS-Page wurde ein 13,5 % iges Gel verwendet.

(B) Densitometrische Quantifizierung des Pals1-Signals, welches auf die Ladekontrolle standardisiert wurde. Das relative Pals1-Verhältnis wurde auf die DLD1 WT-Zelllinie und auf den Wert eins normiert. Für den Western Blot wurden fünf verschiedene Zelllysate verwendet.

5 Diskussion

5.1 Die Relevanz von Pals1 auf die Onkogenese

5.1.1 *Tight junctions*-Komponenten sind in der malignen Zelltransformation involviert

Tight junctions (TJ) sind, als essentielles Mitglied der Zell-Zell-Kontakte, mit verantwortlich für eine strukturierte Epithelzellarchitektur und koordinieren eine Vielzahl von biologischen Zellprozessen [35]. Das evolutionär konservierte Pals1-Protein fungiert als ein elementares Gerüstprotein der TJ und ist insbesondere bei der Herstellung der apikal-basalen Polarität beteiligt [61]. Ein Charakteristikum von Krebs sind Zellpolaritäts-Defekte, die vermutlich eine fundamentale Rolle bei der Tumorentstehung, als auch bei der EMT und der Metastasierung spielen [72, 130]. Eine Vielzahl von Studien belegen, dass zahlreiche TJ-Komponenten direkt oder indirekt durch die Rekrutierung von Signalproteinen in dem Tumorprogressionsprozess involviert sind [68]. Zum Beispiel konnten *Lin et al.* veranschaulichen, dass ein Verlust des Crb3-Transmembranproteins, welches einen direkten Interaktionspartner von Pals1 darstellt, mit einer progredienten Tumorentstehung assoziiert ist [66]. Darüber hinaus hypothesisierten *Bell* und *Thompson*, dass die maligne Transformation von einem intestinalen Adenom zu einem Adenokarzinom auf einen editierten Crb3-Pals1-PATJ-Komplex zurückzuführen ist [70]. Ergänzend dazu führten *Straight et al.* Polaritätsversuche in MDCK-Zellen durch, die aufzeigen, dass ein Pals1-Verlust in spezifische Zelldefekte resultiert [63]. Allerdings liegen derzeit keine isolierten Informationen vor, dass explizit Pals1 eine Rolle bei der Entwicklung eines neoplastischen Phänotyps einnimmt. Aus diesem Grund soll mit dieser Arbeit die Relevanz von Pals1 in Bezug auf die Onkogenese unter Verwendung verschiedener Kolonkarzinomzelllinien besser verstanden werden.

5.1.2 Ein Pals1-Verlust wird über Arf6 in eine Rac1-induzierte Zellmigration reflektiert

Im Allgemeinen offeriert die Verwendung von etablierten *in-vitro* Zelllinien ein Modell, das eine detaillierte Analyse der Tumorprogression erlaubt [131]. In Vorarbeiten wurde die HCT116-Kolonkarzinomzelllinie eingesetzt, um den Einfluss von Pals1 mithilfe einer Knockout-Studie zu verifizieren. *In-vivo* und *in-vitro* Experimente manifestierten eine signifikant erhöhte Zellmotilität der HCT116 Pals1-Mutante konträr zu der WT-Kontrollzelllinie [113, 114]. Um den korrespondierenden Signalmechanismus zu ergründen, wurden verschiedene GTPasen in der HCT116 Δ Pals1-Zelllinie untersucht. Grundsätzlich navigieren kleine GTPasen eine Vielzahl von elementaren Zellprozessen innerhalb eines Organismus (z. B. Zelldifferenzierung, Proliferation und Motilität), weshalb es nicht überraschend erscheint, dass deregulierte GTPasen bei der dysplastischen Zelltransformation vielfach involviert sind [132].

Auf Proteinebene konnte mithilfe des GST-Pulldown-Assays eine abnormale Überexpression von aktivem Rac1 und Arf6 in der HCT116 Δ Pals1-Zelllinie gemessen werden. Mehrere Studien bestätigen, dass Rac1 und Arf6 in verschiedenen Krebserkrankungen auf Proteinebene hochreguliert sind und eine entscheidende Rolle bei der Onkogenese spielen [86, 89].

Insgesamt kann bereits verschiedenen Veröffentlichungen eine potentielle Verbindung zwischen Pals1, Arf6 und Rac1 entnommen werden. Zum einen konstatierten *Fang et al.* unter Verwendung einer massenspektrometrischen Analyse, dass Pals1 an aktivem Arf6 binden kann [98]. Jedoch wurde die massenspektrometrische Analyse lediglich mit Arf6-GTP durchgeführt, sodass unklar ist, ob Pals1 zudem mit Arf6-GDP interagieren kann. Zum anderen ist bekannt, dass Arf6 als ein *upstream*-Regulator für eine Rac1-induzierte Zellmigration fungiert [83, 96, 97].

Resümierend lassen die Versuchsergebnisse der HCT116 Δ Pals1-Zelllinie vermuten, dass im Normalfall Arf6 durch einen Pals1-vermittelten Inhibitionsmechanismus posttranskriptionell reguliert wird. In der Konsequenz führt ein Pals1-Verlust zu einem übermäßig aktiven Arf6-Level. Das hochregulierte Arf6-GTP induziert eigenständig Aktin-Strukturveränderungen und verstärkt parallel die Fähigkeit von Rac1 zur Lamellipodien-Bildung [83, 98]. In Anbetracht dessen wird ein Pals1-Defizit in eine Arf6-gesteuerte und Rac1-modulierende Zellmigration reflektiert. In diesem Zusammenhang kann impliziert werden, dass ein intaktes Pals1-Protein vermutlich

über eine tumorsupprimierende Funktion verfügt und im Umkehrschluss eine Pals1-Mutation einen malignitätsfördernden Phänotyp generiert.

Um die Hypothese zu verifizieren, stellt sich die Frage, ob noch weitere Pals1-Knockout-Krebszellen den gleichen Phänotyp zeigen. Zu diesem Zweck wurden heterogene Darmkrebszelllinien (DLD1, Caco-2, RKO) ausgewählt, bei denen im Vorfeld dieser Arbeit durch die CRISPR/Cas9-Methode bereits Pals1-Knockout-Zelllinien etabliert wurden [128, 129].

Die DLD1-, Caco-2- und RKO-Kolonkarzinomzellen werden als etablierte Krebszellen vielfach in Versuchslaboren eingesetzt. Bei den DLD1 und RKO handelt es sich um MSI-Tumorzellen, während Caco-2 eine MSS-Kolonkarzinomzelllinie darstellt [133].

5.1.3 Eine Pals1-Deletion in den DLD1-, RKO- und Caco-2 Δ Pals1-Zellen resultiert nicht in einer verstärkten Zellmigration

Das Fundament dieser Arbeit wurde durch die umfangreiche Charakterisierung der generierten Pals1-Knockout-Zellen (DLD1, Caco-2, RKO) im direkten Vergleich mit ihren Ursprungszelllinien gelegt.

Einleitend wurden die Kolonkarzinomzelllinien kompetitiv auf ihre Migrations- und Invasionskapazität untersucht. Für die Analyse wurden spezielle Migrations- und invasionsassay durchgeführt, welche realitätsbezogen auf den biologischen Zellmotilitätsmechanismus konzipiert wurden. Für die RKO-Zellen wurde der Migrations- und invasionsassay bereits in Vorarbeiten praktiziert [128]. Gleichwohl die DLD1- und Caco-2-Zellen hinsichtlich der Zellmotilitätsgeschwindigkeit ein heterogenes Verhalten zeigen, verfügen beide Zelllinien über ein ausreichendes Potential zur Migration und Invasion. Allerdings illustrieren die Ergebnisse, dass in den Krebszellen keine signifikante Divergenz zwischen WT und Pals1-Knockout demarkiert werden kann.

Im Anschluss der Zellmotilitätsversuche wurde die Rolle von Rac1 und Arf6 eingehend analysiert. Dazu wurden GST-Pulldown-Assays ausgewertet, welche als exemplarische Western Blot Auszüge und als quantifizierte Graphen dargestellt werden. Grundsätzlich verfügen alle Kolonkarzinomzelllinien über ein manifestes Rac1- und Arf6-Proteingestamtleve. Zudem kann bei den DLD1 und Caco-2 ein gewisses, aktives Rac1-Level gemessen werden. Wohingegen die RKO-Zellen nur ein schwaches Rac1-GTP-Signal aufweisen und alle Kolonkarzinomzellen

augenscheinlich kaum aktives Arf6 besitzen. In diesem Zusammenhang kann davon ausgegangen werden, dass in den RKO-Zellen das totale Rac1 und in allen Krebszellen das totale Arf6 gänzlich in einem inaktiven Zustand vorliegen. Des Weiteren authentifizieren die differierenden, quantitativen Analysen der Rac1 und Arf6 Pulldown-Assays, dass keine Hoch- oder Herunterregulationen zwischen WT und Pals1-Knockout besteht. Diesbezüglich kann davon ausgegangen werden, dass die kleinen GTPasen Rac1 bzw. Arf6 keine Relevanz auf einen Pals1-Verlust in den DLD1, RKO und Caco-2 haben.

Zusammenfassend kann manifestiert werden, dass ein Pals1-Defizit in den DLD1-, Caco-2- und RKO-Zellen nicht mit einer verstärkten Zellmigration- und invasion assoziiert ist. Vor diesem Hintergrund erscheint die aktiv analoge Rac1- bzw. Arf6-Expression zwischen WT und Pals1-Knockout unmittelbar einleuchtend.

5.2 Das SMAP1-Protein kompensiert den Pals1-Verlust in den DLD1-, Caco-2-, RKO-Zelllinien

Die entscheidende Frage die sich daraufhin stellt ist, warum sich diese Knockout-Zellen im Hinblick auf die Zellmotilität divergent zu der HCT116 Δ Pals1-Zelllinie verhalten [113, 114]. Anhand der Pulldown-Assays kann präsumiert werden, dass die Quintessenz der Motilitätsdifferenz auf die unterschiedliche Sensitivität von Arf6 und Rac1 in Bezug auf eine Pals1-Deletion zurückzuführen ist.

Mithilfe einer ausgiebigen Literaturrecherche wurde dem SMAP1-Protein eine potentielle Relevanz zugesprochen. Es ist bereits bekannt, dass SMAP1, als spezielle ArfGAP, eine effektive Inaktivierung von Arf6 organisiert [99]. Darüber hinaus ist SMAP1 prädisponiert für eine MSI-Mutation und sein 10-Adenin-Wiederholungstrakt ist vielfach in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien editiert [94, 102]. Wie zuvor beschrieben, wird vermutet, dass Arf6 von Pals1 posttranskriptionell kontrolliert wird. In Anbetracht dessen haben sowohl SMAP1 als auch Pals1 eine restringierende Wirkung auf Arf6. Die HCT116 Δ Pals1-Zellen verfügen aufgrund ihrer Pals1-Deletion und ihrer additionalen biallelischen SMAP1-Mutation über keinen weiteren effizienten Regulationsmechanismus, um Arf6 zu inhibieren. Dadurch wird eine Signaltransduktion über Rac1 in Gang gesetzt, welche eine verstärkte Zellmigration und -invasion zur Folge hat (s. Abb. 24).

Im Gegensatz zu der HCT116- besitzt die RKO-Zelllinie lediglich eine monoallelische SMAP1-Mutation, sodass noch ein funktionsfähiges Allel vorhanden ist [94, 102]. Demgegenüber verfügen die DLD1- und Caco-2-Kolonkarzinomzelllinien über ein intaktes SMAP1-Gen.

Unter Verwendung einer Western Blot Analyse sollte der Einfluss von SMAP1 auf einen Pals1-Knockout validiert werden (s. Abs. 4.3). Alle Pals1-Knockout-Zellen zeigen eine SMAP1-Überexpression im direkten Vergleich zu der jeweiligen WT-Zelllinie. In diesem Zusammenhang visualisiert die quantifizierte Amplifikation, dass die DLD1 Δ Pals1-Zelllinie die stärkste SMAP1-Hochregulation (über das Zweifache) aufweist, gefolgt von der RKO Δ Pals1- (1,7-fache-Überexprimierung) und der Caco-2 Δ Pals1-Zelllinie (1,3-fache-Überexprimierung). Die Ergebnisse der Western Blot Analysen implizieren, dass die Überexpression des SMAP1-Proteins den Pals1-Verlust in den DLD1-, RKO- und Caco2 Δ Pals1-Zellen kompensiert. In der Konsequenz wird redundantes Arf6-GTP inaktiviert. Aus diesem Grund visualisieren die DLD1-, RKO- und Caco2 Δ Pals1-Zellen keine verstärkte Zellmotilität in den Migrations- und Invasionsassays und keine Hochregulation von aktivem Arf6 und Rac1.

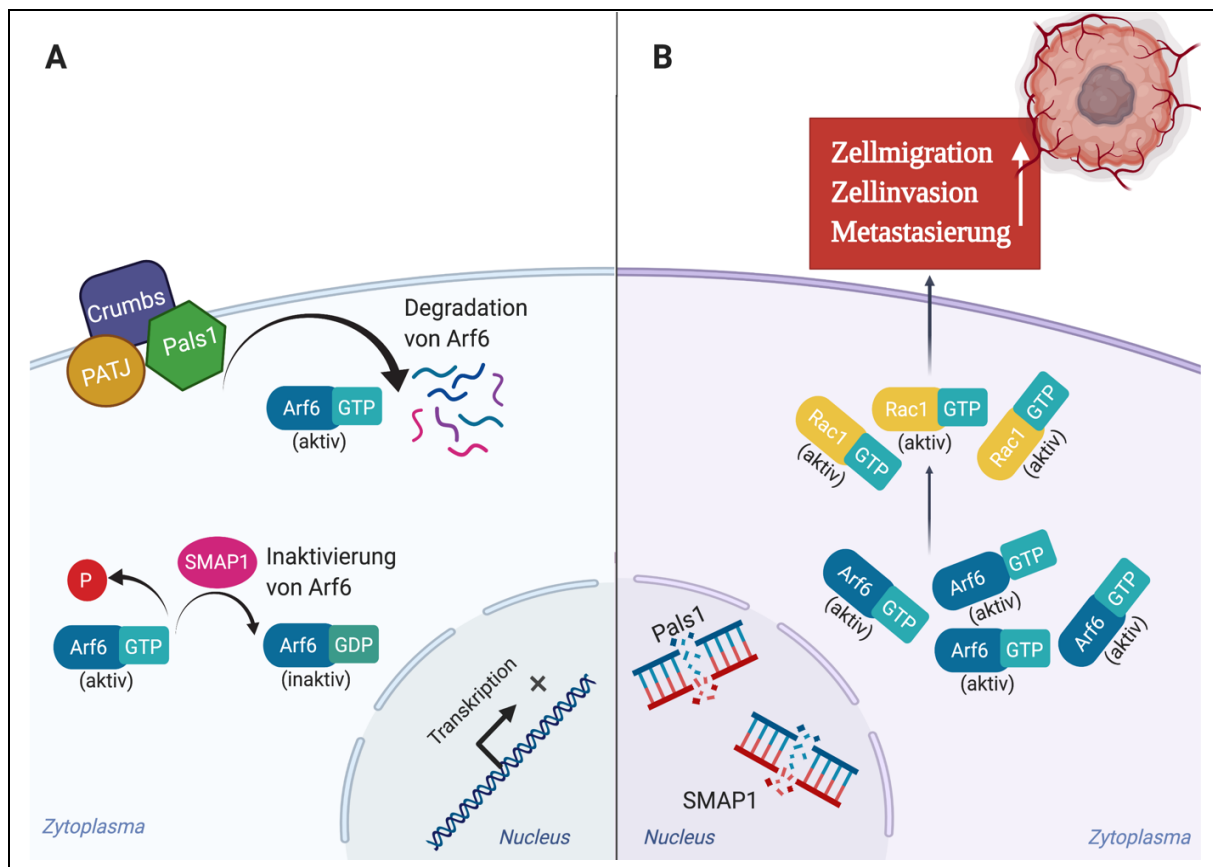


Abbildung 24 Schematische Darstellung des Zusammenspiels von Pals1, SMAP1 und den GTPasen Arf6 und Rac1

In Abbildung 24 A wird die Inhibierung von Arf6 visualisiert. Arf6 wird einerseits von Pals1 posttranskriptionell degradiert und andererseits von SMAP1 inaktiviert. Demgegenüber zeigt Abbildung 24 B, dass aktives Arf6 aufgrund einer Mutation von Pals1 und SMAP1 nicht kontrolliert werden kann. Infolgedessen wird eine Signaltransduktion über Rac1 in Gang gesetzt, die letztlich in eine erhöhte Zellmigration und -invasion reflektiert wird. In der Konsequenz kann sich der Tumor metastatisch im Organismus ausbreiten.

5.3 Die Analyse der kollektiven Abwesenheit von Pals1 und SMAP1 in Bezug auf die Tumorprogression

5.3.1 Die Charakterisierung der etablierten CRISPR/Cas9 Mutanten

Unter Verwendung der CRISPR/Cas9-Technologie wurden weitere Knockout-Zelllinien generiert, um ein umfassenderes Verständnis über die Bedeutung von Pals1 und SMAP1 in Bezug auf die Onkogenese zu erlangen. Im Grunde wurde dabei das Ziel verfolgt, Mutanten zu etablieren, die genotypisch in Assoziation zu der HCT116 Δ Pals1-Zelllinie stehen.

Zum einen wurden die DLD1 WT- und DLD1 Δ Pals1-Zelllinien verwendet, welche beide über ein intaktes SMAP1-Gen verfügen, um einen CRISPR/Cas9-induzierten SMAP1-Knockout zu induzieren. Letztlich wurden für den SMAP1-Knockout die DLD1-Zelllinien ausgewählt, da die DLD1 Pals1-Mutante in der Western Blot Analyse, im Vergleich zu den Caco-2- und RKO-Zellen, die stärkste SMAP1-Überexprimierung veranschaulichte. Aus diesem Grund genießt die DLD1 Δ Pals1-Zelllinie im Hinblick auf eine zusätzliche SMAP1-Mutation den höchsten Stellenwert.

Insgesamt zeigten beide CRISPR-Konstrukte für die Etablierung von SMAP1-Knockout-Zelllinien, in Anbetracht der hohen Anzahl positiver Knockout-Zellklone, eine hohe Effizienz für die Realisierung von genomischen Mutationen.

Die generierte DLD1 Δ SMAP1-Zelllinie (Zellklon A4) besitzt eine kurze Deletion von drei Basenpaaren (Tyrosin, Guanin, Guanin), die allerdings keine Leserasterverschiebung (*Frameshift*) zur Folge haben. Stattdessen kodieren die drei Basenpaare für die Aminosäure Tryptophan, sodass in der Konsequenz Tryptophan nicht in die SMAP1-Polypeptidkette inkludiert wird. In diesem Zusammenhang ist es durchaus fraglich, ob das SMAP1-Protein trotz fehlender Tryptophan-Aminosäure seine Aufgaben korrekt ausüben kann. Diese Mutmaßung kann durch die Western Blot Analyse falsifiziert werden, da in der DLD1 Δ SMAP1-Zelllinie keinerlei SMAP1-Signal gemessen werden konnte. Demzufolge führt der Verlust der Aminosäure Tryptophan zu einem fehlerhaften oder falsch gefalteten Protein. Die zelluläre Proteinqualitätskontrolle identifiziert aberrante Proteine und garantiert deren

Degradierung durch biologische Abbaumechanismen (z.B. Ubiquitin-Proteasom-Weg) [134].

Die Doppel-Knockout-Zelllinie (Δ Pals-SMAP1) wird durch den Zellklon E7 reflektiert, welcher über eine Vielzahl von Nukleotidveränderungen im kodierenden Zielabschnitt verfügt. In diesem Fall erzeugte das NHEJ-Reparatursystem im Anschluss an den Cas9-induzierten DNA-Doppelstrangbruch Insertionen und große Deletionen, wie es in der Literatur auch unter anderem beschrieben wird [122]. Unter diesen Umständen kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der redundanten Nukleotidmutationen das SMAP1-Gen funktionslos ist. Die Western Blot Analyse validiert diese Aussage insofern, dass keine SMAP1-Bande in der DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinie ermittelt werden konnte.

Zum anderen wurden die SW48- und LoVo-Kolonkarzinomzelllinien für einen CRISPR/Cas9-induzierten Pals1-Knockout selektioniert. Diese Krebszelllinien stellen MSI-Tumorzellen dar und besitzen analog zu der HCT116-Zelllinie eine biallelische SMAP1-Mutation im 10-Adenin-Wiederholungstrakt [94, 102]. Zur Überprüfung der fehlenden SMAP1-Expression auf Proteinebene wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Der exemplarische Western Blot Auszug manifestiert, dass in den SW48- und LoVo-Zellen keine SMAP1-Banden zu lokalisieren sind. Demzufolge kann das SMAP1-Gen aufgrund der Mutation nicht in ein Protein translatiert werden und ist damit funktionslos. Die CRISPR/Cas9-Technologie erzeugte in beiden Zelllinien eine identische Punktmutation. Dabei handelt es sich um eine Adenin-Deletion, welche sich drei Basen *upstream* der PAM-Sequenz befindet. Es ist nicht absonderlich, dass bei den SW48- und LoVo Pals1-Mutanten das identische Adenin-Nukleotid betroffen ist, da die Cas9- Nuklease die DNA vornehmlich drei Basen *upstream* der PAM-Sequenz schneidet [121]. Die Nukleotid-Deletion hat letztlich einen *Frameshift* zur Folge, wodurch ein vorzeitiges Stopcodon entsteht. Die mutierte mRNA wird entweder in ein verkürztes, nichtfunktionelles Protein translatiert oder durch das *Nonsense-mediated mRNA Decay System* (NMD) erkannt und degradiert [135]. In der Konsequenz ist in den SW48- und LoVo-Zellen das Pals1-Gen infolge der Punktmutation einschließlich der Leserasterverschiebung defektiv.

Die DLD1 Δ Pals1-SMAP1, SW48 Δ Pals1 und LoVo Δ Pals1 stehen genetisch in Assoziation zu der HCT116 Δ Pals1-Zelllinie. Demgegenüber wurde die DLD1 Δ SMAP1-Zelllinie als Korrelatzelllinie konzipiert, damit verifiziert werden kann,

dass mögliche Zellmotilitätsunterschiede auf das Fehlen von Pals1 und SMAP1 beruhen.

5.3.2 Der simultane Verlust von Pals1 und SMAP1 resultiert in einer verstärkten Zellmotilität in den DLD1-Zellen

Die Zellmotilitätsversuche und die Pulldown-Assays der etablierten DLD1 Δ SMAP1- und DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinien wurden in Kooperation mit den Ursprungszelllinien (DLD1 WT, DLD1 Δ Pals1) durchgeführt, um eine direkte Deviation konstatieren zu können. Darüber hinaus wurden die Zeitangaben und die Experimentbedingungen der Migrations- und Invasionsversuche homolog zu dem Zellmotilitätsvergleich zwischen WT und Δ Pals1 gewählt.

Die Migrations- und Invasionsversuche illustrieren, dass die DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinie eine signifikant verstärkte Zellmigration- und invasion, im direkten Vergleich mit den anderen DLD1-Zelllinien, aufweist. Darüber hinaus verifizieren die Pulldown-Assays, dass die erhöhte Zellmotilität der Doppel-Mutante mit einem hochregulierten aktiven Rac1 und Arf6-Level in Assoziation steht. Die Einzel-Mutanten (DLD1 Δ Pals1, DLD1 Δ SMAP1) besitzen eine Zellmigration und -invasionsbereitschaft korrespondierend zu der WT-Zelllinie. Das aktive Rac1- bzw. Arf6-Level der Einzel-Mutanten ist lediglich minimal abweichend zu der WT-Zelllinie. Diesen geringen Differenzen wird keine Relevanz zugeschrieben, aufgrund der kontrastiven, exorbitanten aktiven Rac1- und Arf6-Überexpression der DLD1 Δ Pals1-SMAP1-Zelllinie.

Abschließend ist anhand der gewonnenen Ergebnisse festzuhalten, dass ein gleichzeitiger Verlust von Pals1 und SMAP1 in der DLD1-Zelllinie in eine Arf6- und Rac1-modulierende erhöhte Zellmigration und -invasion resultiert. Darüber hinaus signalisieren die Einzel-Mutanten, dass die isolierte Anwesenheit von Pals1 oder SMAP1 genügen, um aktives Arf6 in einem physiologischen Umfang suffizient zu kontrollieren.

5.3.3 In den SW48-Zelllinien führt die Pals1-Deletion zu einer erhöhten Zellmigration

Innerhalb der Inkubationszeit für den Migrationsassay organisierte die SW48 Δ Pals1-Zelllinie nahezu eine vollständige Wiederherstellung der konfluenten Monoschicht und demonstrierte somit eine zufriedenstellende Migrationsbereitschaft. Im Unterschied dazu repräsentierte die SW48 WT-Zelllinie nur eine unzulängliche Migrationskapazität, sodass der Pals1-Knockout in der SW48-Zelllinie zu einer signifikant verstärkten Zellmigration führte.

Der Invasionsversuch wurde mit einer Inkubationszeit von 120 h und einem 20 % FCS-haltigem Medium als *Chemoattractant* durchgeführt. Jedoch visualisieren die Übersichtsaufnahmen der Zellkultureinsätze, dass nur wenige Zellen die Fähigkeit besitzen durch die Basalmembran zu invasieren und an der Membranunterseite zu adhären. In der Konsequenz wurde nur eine geringe Zellanzahl mit Kristallviolett angefärbt. Dennoch genügte der gelöste Farbanteil, um die Auswertung des Invasionsassays mithilfe des Mikrotiterplattenreaders sicherzustellen. Das quantifizierte Diagramm in Abbildung 18 veranschaulicht, dass keine Divergenz zwischen SW48 WT und SW48 Δ Pals1 besteht. Letztlich kann davon ausgegangen werden, dass die SW48-Zelllinien grundsätzlich, trotz langer Inkubationszeit (120 h) und erhöhtem Stimulus (20 % FCS), über eine unzulängliche Invasionsbereitschaft verfügen. Aus diesem Grund wird dem Invasionsassay für die Untersuchung, ob die SW48 Δ Pals1-Zelllinie eine erhöhte Zellmotilität aufweist, keine Relevanz zugesprochen.

Die Resultate der Rac1 und Arf6 Pulldown-Assays verdeutlichen, dass die erhöhte Zellmigration der SW48 Δ Pals1-Zelllinie in Zusammenhang mit einer Rac1-GTP und Arf6-GTP Hochregulation steht.

Insgesamt konnte mit der SW48 Δ Pals1-Zelllinie gezeigt werden, dass der zusätzliche Pals1 und SMAP1 Verlust zu einer erhöhten Zellmigration führt, die durch die GTPasen Arf6 und Rac1 moduliert wird.

In diesem Kontext weisen zwei verschiedene Kolonkarzinomzelllinien (DLD1 Δ Pals1-SMAP1 und SW48 Δ Pals1) korrespondierend zu der HCT116 Δ Pals1-Zelllinie einen identischen Phänotyp auf.

5.3.4 Die LoVo Δ Pals1-Zellen demonstrieren ein divergentes Zellmotilitätsverhalten

In dieser Arbeit stellt die LoVo Δ Pals1-Kolonkarzinomzelllinie eine dritte Potenzialität dar, um zu authentifizieren, dass ein gleichzeitiger Pals1 und SMAP1 Verlust eine verstärkte Zellmotilität zur Folge hat. Die Migrations- und Invasionsassays visualisieren, dass die LoVo-Zelllinien eine moderate Fähigkeit zur Migration und Invasion besitzen. Die Assays manifestieren, dass die LoVo WT-Zelllinie eine signifikante höhere Migrationsbereitschaft besitzt, während bei dem Invasionsversuch keine signifikante Divergenz zwischen WT und Pals1-Knockout vorliegt.

In der Gesamtheit kann postuliert werden, dass der Pals1-Knockout in der LoVo-Zelllinie keine malignitätsfördernde Konsequenz impliziert. Mit diesem Verhalten reagiert die LoVo Pals1-Mutante adversativ zu der HCT116 Δ Pals1-, DLD1 Δ Pals1-SMAP1- und der SW48 Δ Pals1-Zelllinie [113, 114]. In diesem Zusammenhang kann davon ausgegangen werden, dass der Signalweg von Pals1, Arf6 und Rac1 in der LoVo Δ Pals1-Zelllinie durch andere Modulatoren interveniert wird.

Die Progression zu einem malignen Tumor, einschließlich der Aneignung migrierender und invasiver Fähigkeiten, ist eine Folge der Akkumulation von genetischen Mutationen in Tumorzellen [95]. Des Weiteren ist das KRK eine Krebserkrankung, die durch eine hohe Heterogenität gekennzeichnet ist und durch verschiedene Arten von genomischen Veränderungen angetrieben wird: CIN, MSI, CIMP [136].

Grundsätzlich existieren noch weitere Interaktionspartner und Inhibitoren von Arf6 und Rac1, die den Aktivitätsstatus beeinflussen können. Ein Beispiel ist die Ubiquitylierung von Arf6, welche durch FBX8 katalysiert wird. Es ist bekannt, dass FBX8 in mehreren Krebszelllinien vermindert ist oder fehlt [79]. Mutmaßlich verfügt die LoVo-Zelllinie trotz additionaler Pals1-Mutation über andere funktionsfähige Akteure, die eine Arf6-Rac1-initiierte erhöhte Zellmotilität unterbinden, welche in den anderen Zelllinien (HCT116, DLD1, SW48) möglicherweise schon editiert, mutiert oder transformiert sind. In dieser Arbeit wurde allerdings von weiteren Experimenten abgesehen, die einen möglichen Beweis für die Verhaltensdifferenz der LoVo-Zelllinie referieren würden.

5.4 Die Evaluierung der polaren Morphologie der unterschiedlichen Kolonkarzinomzelllinien

Pals1 fungiert als Kernpolaritätsprotein der TJ an der apiko-basalen Membran von Epithelzellen und stellt dadurch einen Anhaltspunkt für die existente Ausprägung der Zellpolarität in einer Epithelzelle dar [62]. Unter Verwendung einer Western Blot Analyse wurde die Pals1-Expression in den verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien, die für diese Arbeit verwendet wurden, charakterisiert.

Als erstes wurden alle WT-Kolonkarzinomzelllinien hinsichtlich ihrer Pals1-Expression miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse veranschaulichen, dass die SW48 über die stärkste Pals1-Expression verfügt, gefolgt von der Caco-2 WT- und der LoVo WT-Zelllinie. Demgegenüber besitzen die DLD1 WT- und RKO WT-Zellen eine uniforme Pals1-Expression, die allerdings im Kontrast zu den anderen Kolonkarzinomzellen deutlich niedriger ist. Dementsprechend besitzen die Caco-2- und die SW48-Zelllinien eine manifeste polare Morphologie. Im Kontrast dazu symbolisieren die LoVos und primär die DLD1- und RKO-Zellen zunehmend unpolare Krebszellen.

Nachfolgend wurde die Pals1-Expression der DLD1 Δ SMAP1 im Zusammenhang mit der WT-Zelllinie validiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Pals1-Knockout in den DLD1-, Caco-2- und RKO-Zellen mit einer SMAP1-Hochregulation assoziiert ist. Dementsprechend stellt sich die Frage, ob im Umkehrschluss der SMAP1-Knockout in der DLD1-Zelllinie mit einer Pals1-Überexpression einhergeht.

Die Ergebnisse der Pals1 Western Blot Analysen zeigen auf, dass keine Pals1-Expressionsdifferenz zwischen DLD1 WT und DLD1 Δ SMAP1 besteht. Interessanterweise kann daher assertiert werden, dass die Pals1-Gesamtmenge in den DLD1 Δ SMAP1 ausreicht, um Arf6 ausreichend posttranskriptionell zu inhibieren. Obwohl das Pals1-Gesamtlevel in der DLD1-Zelllinie, im Vergleich zu den anderen Zelllinien, eher als niedrig kategorisiert werden kann, genügt es dennoch, den Organismus vor einer malignen Tumorprogression, einschließlich einer Metastasierung, zu schützen.

Diese Beobachtungen korrelieren mit Ergebnissen aus der Literatur. *Straight* und seine Mitarbeiter praktizierten Knockdown-Experimente mit Pals1 unter Verwendung eines

Polaritätsassays mit MDCK-Zellen. Letztlich führte nur die stärkste Suppression von Pals1 zu einem Phänotyp, der sich in Form von spezifischen Zelldefekten äußerte [63].

6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Pals1 und SMAP1 auf die Tumorgenese, unter Verwendung von etablierten Kolonkarzinomzelllinien und dem CRISPR/Cas9-System, verifiziert. Die Ergebnisse authentifizieren, dass ein simultaner Verlust von Pals1 und SMAP1 in der DLD1- und SW48-Zelllinien zu einer Hochregulation von aktivem Arf6 führt. Diese resultiert in eine übermäßige Rac1-Aktivierung, welche eine verstärkte Zellmigration und bei der DLD1 Δ Pals1-SMAP1 auch eine vermehrte Zellinvasion zur Folge hat. Resümierend bedeutet dies, dass das Fehlen eines elementaren *tight junction* Adaptorproteins und einer spezifischen GAP unmittelbare Auswirkungen auf das Signalproteinnetzwerk hat. Die resultierende Fehlregulation von Arf6 und Rac1 induziert letztlich einen malignitätsfördernden Phänotyp. Dementsprechend können Arf6 und Rac1 bei dem Metastasierungsmechanismus als Schlüsselregulatoren kategorisiert werden, während Pals1 und SMAP1 eine tumorsupprimierende Funktion zugesprochen werden kann.

In der Gesamtheit hat diese Arbeit in ihrer Vielfalt dazu beigetragen, die maligne Entwicklung eines Kolonkarzinoms näher zu verstehen. Aufgrund der exorbitanten Relevanz von Pals1 und SMAP1 im dynamischen Zusammenspiel mit den GTPasen Arf6 und Rac1, sollte die Forschung in diesem Bereich definitiv intensiviert werden. Aus der Literatur geht hervor, dass bisher noch kein selektives Therapeutikum entwickelt ist, um GTPasen wie Arf6 und Rac1 erfolgreich zu liquidieren [137]. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten den nötigen Anlass geben, den genauen posttranskriptionellen Arf6-Degradierungsmechanismus von Pals1 zu verstehen, damit neue Strategien entwickelt werden, um Arf6 und Rac1 erfolgreich zu inaktivieren.

Um die Ergebnisse dieser Arbeit weiter zu untermauern, könnten die RKO- und die Caco-2 Δ Pals1-Zelllinien für weitere Doppel-Knockout-Zelllinien (Pals1-SMAP1) verwendet werden. Mithilfe von Zellmotilitätsversuchen und GST-Pulldown-Assays kann eruiert werden, ob sich das onkogene Potential mit dem zusätzlichen SMAP1-Verlust erhöht. Darüber hinaus veranschaulichen *Sanger et al.* noch weitere etablierte Krebszellen mit unterschiedlichen Gewebeherkünften, die eine biallelische SMAP1-Mutation aufweisen [94]. Diese Kolonkarzinomzellen können ebenfalls verwendet werden, um die grundsätzliche Bedeutung von Pals1 und SMAP1 in malignen Tumoren zu validieren.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde anhand von menschlichen Dickdarmgewebeproben verifiziert, dass eine verringerte Pals1-Expression im Krebsstadium G3 vorliegt [114]. In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit schlage ich vor, histopathologische Darmkrebsproben aus verschiedenen Differenzierungsstadien auf die Expression von Pals1 und SMAP1 zu untersuchen. In diesem Zusammenhang ist es hochspannend zu sehen, inwiefern Pals1- und SMAP1-Mutationen gleichzeitig auftreten und ob sie mit einem spezifischen Krankheitsstadium assoziiert sind. Wird die wesentliche Bedeutung von Pals1 und SMAP1 als onkogene Zielgene weiterhin bestätigt und korrelieren sie gegebenenfalls mit spezifischen Krankheitsstadien, könnten sie als prognostische Marker eingesetzt werden.

Des Weiteren könnte die Forschung in Bezug auf die LoVo-Zelllinie intensiviert werden, um herauszufinden, aus welchem Grund diese Zelllinie eine divergente Verhaltensweise präsentiert. Die resultierenden Ergebnisse könnten weitere Interaktionspartner oder Regulatoren von Pals1 und SMAP1 offenbaren.

7 Zusammenfassung

Die Analyse des molekularen Mechanismus der Regulation der Zellmigration durch Pals1

Das kolorektale Karzinom ist eine prävalente Krebserkrankung, die jedes Jahr weltweit eine hohe Anzahl an Todesopfern fordert. Ein Attribut von Krebs, einschließlich Darmkrebs, ist der Verlust der Zellpolarität. Das *tight junctions* assoziierte Pals1-Protein ist ein elementarer Bestandteil des evolutionär konservierten Crb3-Pals1-PATJ-Komplexes und wesentlich an der Herstellung der apiko-basalen-Zellpolarität beteiligt. Eine Dysregulation von Polaritätsproteinen wird im Zusammenhang mit der dynamischen Protektion von GTPasen eine potentielle Bedeutung bei der Tumorentstehung zugesprochen. Um den Stellenwert von Pals1 im Hinblick auf die Tumorentwicklung zu eruieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene etablierte Kolonkarzinomzelllinien (DLD1, RKO, Caco-2) verwendet. Diese Krebszelllinien fungieren als Basis für die Generierung von Pals1-Knockout-Zelllinien, die bereits in Vorarbeiten durch das CRISPR/Cas9-System etabliert wurden. Im Rahmen von *in-vitro* Zellmigrations- und Zellinvasionsversuchen, Rac1 und Arf6 GST-Pulldown-Assays wurden die Pals1-Knockout-Zellen mit den Ursprungszelllinien umfassend charakterisiert. Die gewonnenen Ergebnisse der Assays zeigen eine kongruente Verhaltensweise der WT-Zelllinien und Pals1-Mutanten.

Eine ausgiebige Literaturrecherche manifestiert eine potentielle Relevanz von SMAP1, eine spezifische Arf6-GAP. SMAP1 verfügt über einen 10-Adenin-Wiederholungstrakt, welcher prädisponiert für MSI-Mutationen ist. Eine Vielzahl von Kolonkarzinom-Zelllinien weisen SMAP1-Mutationen auf, allerdings verfügen die DLD1-, Caco-2- und RKO-Zelllinien über ein funktionsfähiges SMAP1-Protein. Eine Western Blot Analyse verifiziert, dass in den Pals1-Knockout-Zelllinien das SMAP1-Protein exorbitant hochreguliert ist. Mithilfe weiterer Kolonkarzinomzelllinien (SW48, LoVo) und der Etablierung zusätzlicher CRISPR/Cas9-Mutanten (DLD1 Δ Pals1-SMAP1, SW48 Δ Pals1, LoVo Δ Pals1) konnte validiert werden, dass ein simultaner Pals1- und SMAP1-Verlust in der DLD1- und SW48-Zelllinie zu einer verstärkten Zellmotilität führt. Pals1 und SMAP1 induzieren komplementär die Inhibierung von Arf6, weshalb ein additionales Pals1-SMAP1-Defizit zu einer exzessiv aktiven Arf6-Hochregulation führt. Arf6-GTP interagiert wiederum mit Rac1-GDP, wodurch ein dynamisches Zusammenspiel dieser GTPasen in eine verstärkte Zellmigration reflektiert wird. Resümierend verdeutlichen die erzielten Ergebnisse, dass Pals1 und SMAP1 eine tumorsupprimierende Funktion zugesprochen werden kann und sie als mögliche onkogene Zielgene betrachtet werden können.

8 Summary

Analysis of the molecular mechanism of cell migration regulated by Pals1

Colorectal cancer is a prevalent disease that causes a large number of people worldwide every year. A hallmark of cancer, including colorectal cancer, is the loss of cell polarity. The tight junction associated Pals1 protein is an elementary component of the evolutionary conserved Crb3-Pals1-PATJ complex and is significantly involved in the establishment of apical–basal polarity in epithelial cells. Dysregulation of core polarity proteins is considered to play a crucial role in tumorigenesis in connection with the involvement of special GTPases.

In order to determine the importance of Pals1 in tumor development, several established colon carcinoma cell lines (DLD1, RKO, Caco-2) were used in this work. These cancer cell lines were used for the generation of Pals1 knockout cell lines, which have already been established in preliminary work by the CRISPR/ Cas9 system. In the context of in-vitro cell migration and cell invasion experiments, Rac1 and Arf6 GST pull-down assays, the Pals1 knockout cells were sufficiently characterized in connection with the WT cell lines. The obtained results of the assays show a similar behaviour of WT cell lines and Pals1 mutants.

An extensive literature search manifests a potential relevance of SMAP1, a specific Arf6-GAP. SMAP1 has a 10-adenine tract, which is predisposed to MSI mutations. A large number of colon cancer cell lines have SMAP1 mutations, but the DLD1, Caco-2 and RKO cell lines have a functional SMAP1 protein. A Western blot analysis verifies that the SMAP1 protein is exorbitantly upregulated in the Pals1 knockout cell lines. Through further colon cancer cell lines (SW48, LoVo) and the establishment of additional CRISPR/Cas9 mutants (DLD1 Δ Pals1-SMAP1, SW48 Δ Pals1, LoVo Δ Pals1) it could be validated that a simultaneous Pals1 and SMAP1 loss in the DLD1 and SW48 cell line leads to increased cell motility. Pals1 and SMAP1 complementarily induce the inhibition of Arf6-GTP, therefore an additional Pals1-SMAP1 deficit leads to excessive active Arf6 upregulation. Arf6-GTP interacts with Rac1-GDP, which is reflected in a Rac1-induced increased cell migration. In summary, the results show that Pals1 and SMAP1 can be assigned a tumor suppressing function and can be considered as possible oncogenic target genes.

Literaturverzeichnis

1. Kuipers, E.J., et al., *Colorectal cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15065.
2. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
3. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
4. Centelles, J.J., *General aspects of colorectal cancer*. ISRN Oncol, 2012. **2012**: p. 139268.
5. Yamane, L., et al., *Serrated pathway in colorectal carcinogenesis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(10): p. 2634-40.
6. Boeker, M., et al., *TNM-O: ontology support for staging of malignant tumours*. J Biomed Semantics, 2016. **7**(1): p. 64.
7. Nojadeh, J.N., S. Behrouz Sharif, and E. Sakhinia, *Microsatellite instability in colorectal cancer*. EXCLI J, 2018. **17**: p. 159-168.
8. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell, 1996. **87**(2): p. 159-70.
9. Simon, K., *Colorectal cancer development and advances in screening*. Clin Interv Aging, 2016. **11**: p. 967-76.
10. Thanikachalam, K. and G. Khan, *Colorectal Cancer and Nutrition*. Nutrients, 2019. **11**(1).
11. Kuepper, C., et al., *Label-free classification of colon cancer grading using infrared spectral histopathology*. Faraday Discuss, 2016. **187**: p. 105-18.
12. De Rosa, M., et al., *Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review)*. Oncol Rep, 2015. **34**(3): p. 1087-96.
13. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(6): p. 1471-4.
14. Tauriello, D.V., et al., *Determinants of metastatic competency in colorectal cancer*. Mol Oncol, 2017. **11**(1): p. 97-119.
15. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
16. McGranahan, N., et al., *Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges*. EMBO Rep, 2012. **13**(6): p. 528-38.
17. De Palma, F.D.E., et al., *The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer*. Cancers (Basel), 2019. **11**(7).
18. Woerner, S.M., et al., *SeITabase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D682-9.
19. Gadgil, R., et al., *Replication stalling and DNA microsatellite instability*. Biophys Chem, 2017. **225**: p. 38-48.
20. El-Bchiri, J., et al., *Differential nonsense mediated decay of mutated mRNAs in mismatch repair deficient colorectal cancers*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(16): p. 2435-42.
21. Korff, S., et al., *Frameshift mutations in coding repeats of protein tyrosine phosphatase genes in colorectal tumors with microsatellite instability*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 329.

22. Murphy, K.M., et al., *Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers*. J Mol Diagn, 2006. **8**(3): p. 305-11.
23. Woerner, S.M., et al., *Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes*. Oncogene, 2003. **22**(15): p. 2226-35.
24. Woerner, S.M., et al., *Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas*. Oncogene, 2005. **24**(15): p. 2525-35.
25. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
26. Seyfried, T.N. and L.C. Huysentruyt, *On the origin of cancer metastasis*. Crit Rev Oncog, 2013. **18**(1-2): p. 43-73.
27. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
28. Vu, T. and P.K. Datta, *Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis*. Cancers (Basel), 2017. **9**(12).
29. Boyer, B. and J.P. Thiery, *Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity*. APMIS, 1993. **101**(4): p. 257-68.
30. Parri, M. and P. Chiarugi, *Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control*. Cell Commun Signal, 2010. **8**: p. 23.
31. Kalluri, R., *EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1417-9.
32. Roche, J., *The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer*. Cancers (Basel), 2018. **10**(2).
33. Tsai, J.H. and J. Yang, *Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis*. Genes Dev, 2013. **27**(20): p. 2192-206.
34. Zihni, C. and S.J. Terry, *RhoGTPase signalling at epithelial tight junctions: Bridging the GAP between polarity and cancer*. Int J Biochem Cell Biol, 2015. **64**: p. 120-5.
35. Rusu, A.D. and M. Georgiou, *The multifarious regulation of the apical junctional complex*. Open Biol, 2020. **10**(2): p. 190278.
36. Coradini, D., C. Casarsa, and S. Oriana, *Epithelial cell polarity and tumorigenesis: new perspectives for cancer detection and treatment*. Acta Pharmacol Sin, 2011. **32**(5): p. 552-64.
37. Garcia, M.A., W.J. Nelson, and N. Chavez, *Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(4).
38. Le Bras, S. and R. Le Borgne, *Epithelial cell division - multiplying without losing touch*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 24): p. 5127-37.
39. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
40. Guo, X., et al., *Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: a novel function for polyamines*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(5): p. C1174-87.
41. Wang, Q. and B. Margolis, *Apical junctional complexes and cell polarity*. Kidney Int, 2007. **72**(12): p. 1448-58.
42. Citi, S., et al., *Regulation of small GTPases at epithelial cell-cell junctions*. Mol Membr Biol, 2011. **28**(7-8): p. 427-44.
43. Balda, M.S. and K. Matter, *Tight junctions at a glance*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 22): p. 3677-82.

44. Zihni, C., et al., *Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(9): p. 564-80.
45. Heinemann, U. and A. Schuetz, *Structural Features of Tight-Junction Proteins*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(23).
46. Zihni, C., M.S. Balda, and K. Matter, *Signalling at tight junctions during epithelial differentiation and microbial pathogenesis*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 16): p. 3401-13.
47. Giepmans, B.N. and S.C. van Ijzendoorn, *Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(4): p. 820-31.
48. Hartsock, A. and W.J. Nelson, *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 660-9.
49. Bartle, E.I., et al., *Bridging the gap: Super-resolution microscopy of epithelial cell junctions*. Tissue Barriers, 2018. **6**(1): p. e1404189.
50. Franke, W.W., et al., *The junctions that don't fit the scheme: special symmetrical cell-cell junctions of their own kind*. Cell Tissue Res, 2009. **338**(1): p. 1-17.
51. Ivanov, A.I., et al., *Tumor suppressor scribble regulates assembly of tight junctions in the intestinal epithelium*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 134-45.
52. Mack, N.A. and M. Georgiou, *The interdependence of the Rho GTPases and apicobasal cell polarity*. Small GTPases, 2014. **5**(2): p. 10.
53. Djuric, I., et al., *The C-terminal domain controls the mobility of Crumbs 3 isoforms*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(6 Pt A): p. 1208-17.
54. Campanale, J.P., T.Y. Sun, and D.J. Montell, *Development and dynamics of cell polarity at a glance*. J Cell Sci, 2017. **130**(7): p. 1201-1207.
55. Li, X.M., et al., *Genes Regulating Epithelial Polarity Are Critical Suppressors of Esophageal Oncogenesis*. J Cancer, 2015. **6**(8): p. 694-700.
56. Brinkmann, B.F., et al., *VE-cadherin interacts with cell polarity protein Pals1 to regulate vascular lumen formation*. Mol Biol Cell, 2016. **27**(18): p. 2811-21.
57. Shin, K., V.C. Fogg, and B. Margolis, *Tight junctions and cell polarity*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 207-35.
58. Ivanova, M.E., et al., *Structures of the human Pals1 PDZ domain with and without ligand suggest gated access of Crb to the PDZ peptide-binding groove*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2015. **71**(Pt 3): p. 555-64.
59. Weide, T., et al., *Pals1 Haploinsufficiency Results in Proteinuria and Cyst Formation*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(7): p. 2093-2107.
60. Teoh, K.T., et al., *The SARS coronavirus E protein interacts with PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(22): p. 3838-52.
61. Roh, M.H., et al., *The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost*. J Cell Biol, 2002. **157**(1): p. 161-72.
62. Sen, A., R. Sun, and M.P. Krahn, *Localization and Function of Pals1-associated Tight Junction Protein in Drosophila Is Regulated by Two Distinct Apical Complexes*. J Biol Chem, 2015. **290**(21): p. 13224-33.
63. Straight, S.W., et al., *Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(4): p. 1981-90.
64. Wang, Q., X.W. Chen, and B. Margolis, *PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(3): p. 874-85.

65. Royer, C. and X. Lu, *Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer?* Cell Death Differ, 2011. **18**(9): p. 1470-7.
66. Li, P., et al., *Epithelial cell polarity determinant CRB3 in cancer development.* Int J Biol Sci, 2015. **11**(1): p. 31-7.
67. Lin, W.H., Y.W. Asmann, and P.Z. Anastasiadis, *Expression of polarity genes in human cancer.* Cancer Inform, 2015. **14**(Suppl 3): p. 15-28.
68. Bhat, A.A., et al., *Tight Junction Proteins and Signaling Pathways in Cancer and Inflammation: A Functional Crosstalk.* Front Physiol, 2018. **9**: p. 1942.
69. Huang, L. and S.K. Muthuswamy, *Polarity protein alterations in carcinoma: a focus on emerging roles for polarity regulators.* Curr Opin Genet Dev, 2010. **20**(1): p. 41-50.
70. Bell, G.P. and B.J. Thompson, *Colorectal cancer progression: lessons from Drosophila?* Semin Cell Dev Biol, 2014. **28**: p. 70-7.
71. Karp, C.M., et al., *Role of the polarity determinant crumbs in suppressing mammalian epithelial tumor progression.* Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4105-15.
72. Martin, T.A., M.D. Mason, and W.G. Jiang, *Tight junctions in cancer metastasis.* Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 898-936.
73. Reiner, D.J. and E.A. Lundquist, *Small GTPases.* WormBook, 2018. **2018**: p. 1-65.
74. Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der, *The Ras superfamily at a glance.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 843-6.
75. Qu, L., et al., *The Ras Superfamily of Small GTPases in Non-neoplastic Cerebral Diseases.* Front Mol Neurosci, 2019. **12**: p. 121.
76. Fortin Ensign, S.P., et al., *Implications of Rho GTPase Signaling in Glioma Cell Invasion and Tumor Progression.* Front Oncol, 2013. **3**: p. 241.
77. Heasman, S.J. and A.J. Ridley, *Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(9): p. 690-701.
78. Aspenstrom, P., *The Intrinsic GDP/GTP Exchange Activities of Cdc42 and Rac1 Are Critical Determinants for Their Specific Effects on Mobilization of the Actin Filament System.* Cells, 2019. **8**(7).
79. Donaldson, J.G. and C.L. Jackson, *ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(6): p. 362-75.
80. Price, L.S. and J.G. Collard, *Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion.* Semin Cancer Biol, 2001. **11**(2): p. 167-73.
81. Jou, T.S. and W.J. Nelson, *Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity.* J Cell Biol, 1998. **142**(1): p. 85-100.
82. Didsbury, J., et al., *rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates.* J Biol Chem, 1989. **264**(28): p. 16378-82.
83. Radhakrishna, H., et al., *ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements.* J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 6): p. 855-66.
84. Jordan, P., et al., *Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors.* Oncogene, 1999. **18**(48): p. 6835-9.

85. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
86. Bosco, E.E., J.C. Mulloy, and Y. Zheng, *Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(3): p. 370-4.
87. Marei, H. and A. Malliri, *GEFs: Dual regulation of Rac1 signaling*. Small GTPases, 2017. **8**(2): p. 90-99.
88. Inoue, H. and P.A. Randazzo, *Arf GAPs and their interacting proteins*. Traffic, 2007. **8**(11): p. 1465-75.
89. Osmani, N., et al., *Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic*. J Cell Biol, 2010. **191**(7): p. 1261-9.
90. Natsume, W., et al., *SMAP2, a novel ARF GTPase-activating protein, interacts with clathrin and clathrin assembly protein and functions on the AP-1-positive early endosome/trans-Golgi network*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(6): p. 2592-603.
91. Donaldson, J.G. and C.L. Jackson, *Regulators and effectors of the ARF GTPases*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(4): p. 475-82.
92. Balasubramanian, N., et al., *Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(12): p. 1381-91.
93. Fritz, G., et al., *Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters*. Br J Cancer, 2002. **87**(6): p. 635-44.
94. Sangar, F., et al., *Involvement of small ArfGAP1 (SMAP1), a novel Arf6-specific GTPase-activating protein, in microsatellite instability oncogenesis*. Oncogene, 2014. **33**(21): p. 2758-67.
95. Sabe, H., et al., *The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis*. Traffic, 2009. **10**(8): p. 982-93.
96. Santy, L.C. and J.E. Casanova, *Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D*. J Cell Biol, 2001. **154**(3): p. 599-610.
97. Cotton, M., et al., *Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(2): p. 501-11.
98. Fang, Z., et al., *Proteomic identification and functional characterization of a novel ARF6 GTPase-activating protein, ACAP4*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(8): p. 1437-49.
99. Tanabe, K., et al., *A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(4): p. 1617-28.
100. Kon, S., et al., *Clathrin dependent endocytosis of E-cadherin is regulated by the Arf6GAP isoform SMAP1*. Exp Cell Res, 2008. **314**(7): p. 1415-28.
101. Tanabe, K., et al., *A SMAP gene family encoding ARF GTPase-activating proteins and its implication in membrane trafficking*. Methods Enzymol, 2008. **438**: p. 155-70.
102. S.M. Woerner, Y.P.Y., A. Benner, S. Korff, M.v. Knebel Doeberitz, and P. Bork. *SeITarbase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology*. 2010 [cited 2020 23.03]; Available from: <http://www.seltarbase.org/?extension=latest&topic=regression&term=CRC>
103. Sumiyoshi, M., et al., *Mice doubly-deficient in the Arf GAPs SMAP1 and SMAP2 exhibit embryonic lethality*. FEBS Lett, 2015. **589**(19 Pt B): p. 2754-62.

104. Woldemeskel, M., I. Hawkins, and L. Whittington, *Ki-67 protein expression and tumor associated inflammatory cells (macrophages and mast cells) in canine colorectal carcinoma*. BMC Vet Res, 2017. **13**(1): p. 111.
105. Fossum, T.W., *Surgery of the Digestive System: Specific diseases: Neoplasia*, in *Small Animal Surgery Fourth Edition*. 2012, Elsevier p. 543-546.
106. Gordon, I., et al., *The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway*. PLoS Med, 2009. **6**(10): p. e1000161.
107. Tang, J., et al., *Copy number abnormalities in sporadic canine colorectal cancers*. Genome Res, 2010. **20**(3): p. 341-50.
108. Rowell, J.L., D.O. McCarthy, and C.E. Alvarez, *Dog models of naturally occurring cancer*. Trends Mol Med, 2011. **17**(7): p. 380-8.
109. Wang, J., et al., *Proliferative and Invasive Colorectal Tumors in Pet Dogs Provide Unique Insights into Human Colorectal Cancer*. Cancers (Basel), 2018. **10**(9).
110. Tang, J., et al., *Cancer driver-passenger distinction via sporadic human and dog cancer comparison: a proof-of-principle study with colorectal cancer*. Oncogene, 2014. **33**(7): p. 814-22.
111. Breen, M., *Update on genomics in veterinary oncology*. Top Companion Anim Med, 2009. **24**(3): p. 113-21.
112. Khanna, C., et al., *The dog as a cancer model*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(9): p. 1065-6.
113. Lüttgenau, S., *Loss of Pals1 enhances cell migration by promoting Arf6-dependent Rac1 activity in colorectal cancer cells*. Universitätsklinikum Münster Medizinische Klinik D Abteilung Medizinische Zellbiologie, (unveröffentlichte Dissertation).
114. Panichkina, O., *Pals1 functions as a tumor suppressor regulating cell polarity, Hippo signaling and cancer progression*. Universität Regensburg, 2017.
115. Rahdar, M., et al., *Synthetic CRISPR RNA-Cas9-guided genome editing in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(51): p. E7110-7.
116. Bhaya, D., M. Davison, and R. Barrangou, *CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation*. Annu Rev Genet, 2011. **45**: p. 273-97.
117. Wiedenheft, B., S.H. Sternberg, and J.A. Doudna, *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 331-8.
118. Terns, M.P. and R.M. Terns, *CRISPR-based adaptive immune systems*. Curr Opin Microbiol, 2011. **14**(3): p. 321-7.
119. Broeders, M., et al., *Sharpening the Molecular Scissors: Advances in Gene-Editing Technology*. iScience, 2020. **23**(1): p. 100789.
120. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
121. Wu, X., A.J. Kriz, and P.A. Sharp, *Target specificity of the CRISPR-Cas9 system*. Quant Biol, 2014. **2**(2): p. 59-70.
122. Shin, H.Y., et al., *CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions at 17 sites in the mouse genome*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15464.
123. Kleinstiver, B.P., et al., *Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities*. Nature, 2015. **523**(7561): p. 481-5.
124. Rahel de Bruyn, V.D., Martin Wegner, Manuel Kaulich, *CRISPR/Cas applications in preclinical research*. 2017.

125. Zhang, Z., et al., *CRISPR/Cas9 Genome-Editing System in Human Stem Cells: Current Status and Future Prospects*. Mol Ther Nucleic Acids, 2017. **9**: p. 230-241.
126. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
127. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
128. Schowe, L., Universitätsklinikum Münster Medizinische Klinik D Abteilung Medizinische Zellbiologie, (unveröffentlichte Dissertation).
129. Weber, A.K., Universitätsklinikum Münster Medizinische Klinik D Abteilung Medizinische Zellbiologie, (unveröffentlichte Dissertation).
130. Gonzalez-Mariscal, L., et al., *Tight junctions and the regulation of gene expression*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **36**: p. 213-23.
131. Brown, J.L., et al., *Clonal analysis of a bladder cancer cell line: an experimental model of tumour heterogeneity*. Br J Cancer, 1990. **61**(3): p. 369-76.
132. Prieto-Dominguez, N., C. Parnell, and Y. Teng, *Drugging the Small GTPase Pathways in Cancer Treatment: Promises and Challenges*. Cells, 2019. **8**(3).
133. Berg, K.C.G., et al., *Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 116.
134. Chen, B., et al., *Cellular strategies of protein quality control*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(8): p. a004374.
135. Chen, D., et al., *CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by complete or stochastic altering splicing in the migratory locust*. BMC Biotechnol, 2018. **18**(1): p. 60.
136. Ronen, J., S. Hayat, and A. Akalin, *Evaluation of colorectal cancer subtypes and cell lines using deep learning*. Life Sci Alliance, 2019. **2**(6).
137. Zhao, W., et al., *Direct Targeting of the Ras GTPase Superfamily Through Structure- Based Design*. Curr Top Med Chem, 2017. **17**(1): p. 16-29.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisches Modell der epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT) bei der Metastasierung von Tumoren	10
Abbildung 2: Komposition der epithelialen Zell-Zell-Kontakte.....	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Crb3-Pals1-PATJ-Komplexes in Verbindung mit den unterschiedlichen funktionellen Bindungsdomänen	16
Abbildung 4: Der Aktivierungszyklus der GTPasen am Beispiel von Arf6.....	20
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Invasionsassays	47
Abbildung 6 Das CRISPR/Cas9 System.....	49
Abbildung 7: Migrationsassay und Invasionsassay von DLD1 WT/ DLD1 Δ Pals1.....	63
Abbildung 8: Migrationsassay und Invasionsassay von Caco-2 WT/ Caco-2 Δ Pals1	64
Abbildung 9: Nachweis des totalen und aktiven Rac1-Levels via GST-Pulldown-Assay bei DLD1 WT/ Δ Pals1, RKO WT/ Δ Pals1, Caco-2 WT/ Δ Pals1	66
Abbildung 10: Nachweis von totalen und aktiven Arf6-Levels via GST-Pulldown-Assay bei DLD1 WT/ Δ Pals1, RKO WT/ Δ Pals1, Caco-2 WT/ Δ Pals1	68
Abbildung 11: Vergleichende Western Blot Analyse der WT-Zelllinien DLD1, RKO- und Caco-2 mit den abgeleiteten Pals1-Knockout-Zellen.....	70
Abbildung 12: Sequenzierungsdaten und Western Blot Analyse der etablierten SMAP1-Knockout-Zelllinien.....	73
Abbildung 13: Vergleichende Western Blot Analyse von den folgenden WT-Zelllinien: DLD1, Caco-2, RKO, SW48, LoVo.....	75
Abbildung 14: Sequenzierungsdaten und Western Blot Analyse der etablierten Pals1-Knockout-Zelllinien	76
Abbildung 15: Migrationsassay und Invasionsassay der verschiedenen DLD1-Varianten	78
Abbildung 16: Nachweis des totalen und aktiven Rac1-Levels via GST-Pulldown-Assay bei DLD1 WT/ Δ Pals1/ Δ SMAP1/ Δ Pals1-SMAP1	80
Abbildung 17: Nachweis des totalen und aktiven Arf6-Levels via GST-Pulldown-Assay bei DLD1 WT/ Δ Pals1/ Δ SMAP1/ Δ Pals1-SMAP1.....	82
Abbildung 18: Migrationsassay und Invasionsassay von SW48 WT/ SW48 Δ Pals1	84
Abbildung 19: Nachweis des totalen und aktiven Rac1-Levels via GST-Pulldown-Assay bei SW48 WT/ SW48 Δ Pals1.....	85
Abbildung 20: Nachweis des totalen und aktiven Arf6-Levels via GST-Pulldown-Assay bei SW48 WT/ SW48 Δ Pals1.....	86
Abbildung 21: Migrationsassay und Invasionsassay von LoVo WT/ LoVo Δ Pals1.....	88
Abbildung 22: Vergleichende Western Blot Analyse zur Analyse der Pals1-Expression in DLD1, Caco-2, RKO, SW48 und LoVo	90
Abbildung 23: Vergleichende Western Blot Analyse zur Analyse der Pals1-Expression in DLD1 WT/ DLD1 Δ SMAP1	91
Abbildung 24 Schematische Darstellung des Zusammenspiels von Pals1, SMAP1 und den GTPasen Arf6 und Rac1.....	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	28
Tabelle 2: Laborbedarf	30
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien	31
Tabelle 4: Puffer und Lösungen	33
Tabelle 5: Enzyme	35
Tabelle 6: Kommerzielle Kits.....	35
Tabelle 7: Plasmid.....	35
Tabelle 8: CRISPR/Cas9 Konstrukte	36
Tabelle 9: Vektoren für GST-Pulldown-Assay	36
Tabelle 10: Sequenzierungsprimer	36
Tabelle 11: Primäre Antikörper	37
Tabelle 12: Sekundäre Antikörper	37
Tabelle 13: Bakterienstämme	37
Tabelle 14: Eukaryotische Zelllinien	38
Tabelle 15: Kommerzielle Zellkulturmedien.....	39
Tabelle 16: Software, Datenbanken, Suchmaschinen.....	39
Tabelle 17: Angabe der Zellzahl und der Inkubationszeit für den Migrationsassay bei den verwendeten Zelllinien	44
Tabelle 18: Angabe der Inkubationszeit und prozentualer Anteil des FCS bei den verwendeten Zelllinien für den Invasionsassay.....	46
Tabelle 19: Standard-Mastermix für die Genotypisierungs-PCR.....	52
Tabelle 20: Thermocyclerprogramm für die Genotypisierungs-PCR	52
Tabelle 21: Zusammensetzung der Sammelgele und Trenngele für die SDS-PAGE	56

Abkürzungsverzeichnis

AJ	Adherens junctions
aPKC	Atypical protein kinase C
Arf	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
Arf6	ADP-Ribosylierungsfaktor 6
BME	Basalmembranextrakt
BSA	Bovines serum albumine
CALM	Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukämie
CAS9	CRISPR associated protein 9
CIMP	CpG-Insel-Methylator-Phänotyp
CIN	Chromosomaleinstabilität
Crb3	Crumbs3
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRISPR-RNA
Dlg	Discs large protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECD	Extrazelluläre Domäne
EMT	Epitheliale-mesenchymale-Transition
FAP	Familiäre adenomatösen Polyposis
FCS	Fetales Kälberserum
GAPs	GTPase-aktivierende Proteine
GEFs	Guanin-Nukleotidaustauschfaktoren
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GIDs	Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	Guanosintriphosphatasen
GUK	Guanylatekinase
HDR	Homologe Rekombination
HNPCC	Hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom
HRP	Meerrettichperoxidase

ICD	Intrazelluläre Domäne
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KRK	Kolorektales Karzinom
Lgl	Lethal giant larvae protein
MAGUK	Membrane-assoziierte Guanylatekinase
MET	Mesenchymale-epitheliale-Transition
MPP	Membrane palmitoylated protein
MPP5	Membrane palmitoylated protein 5
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
NCI	National Cancer Institute
NHEJ	Nicht-homologes End-Joining
NMD-System	Nonsense-mediated mRNA Decay System
Nok	Nagie Oko
N-terminal	Aminoterminal
OD	Optische Dichte
Pals1	Protein associated with Lin Seven
PAM	Protospacer adjacent motif
Par	Partitioning defective Proteins
PATJ	Pals1-associated tight junction protein
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rho	Ras-homolog
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Scrib	Scribble protein
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis
Sdt	Stardust
sgRNA	Single-guide RNA
SH3	Src Homology 3
SMAP1	Stromal membrane associated protein 1
TJ	tight junctions

TM	Transmembranregion
tracrRNA	Trans-activating crRNA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UICC	Union internationale contre le cancer
WHO	World health organisation
WT	Wildtyp
ZO-1, 2, 3	Zonula occludens-1

Anhang

Danksagung

Zum Abschluss meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken, die mir meine Arbeit ermöglicht bzw. wesentlich dazu beigetragen haben.

Einen großen Dank möchte ich an Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. rer. nat. Michael Krahn aussprechen. Vielen Dank für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, die idealen Arbeitsbedingungen, die erstklassige Betreuung und die zahlreichen Anregungen und Ideen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. med. vet. Thomas Göbel für die Unterstützung meiner externen Arbeit von der Tierärztlichen Fakultät der Universität München bedanken.

Bei der Stiftung "Nachlass Dr. Karl Heinz Kurtze" möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bedanken, sodass ich mich in Gänze auf meine wissenschaftliche Arbeit fokussieren konnte.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern, naturwissenschaftlichen und medizinischen Doktoranden des Instituts für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Die tolle Atmosphäre, die fachlichen Ratschläge und die moralische Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt dabei an Simona Lüttgenau. Vielen Dank für die exzellente Einarbeitung, dein Engagement und deine motivierenden Worte, wenn ein Versuch nicht funktioniert hat. Zudem möchte ich bei Pavel Nedvetsky - der guten Seele im Haus – bedanken. Vielen Dank für die stetige Hilfestellung und die lehrreichen Tipps.

Ich danke Viktor Schmitz, Annika Emming und Tina Terhaar für ihr Engagement bei der Korrektur meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Freund Viktor Schmitz. Vielen Dank für dein Verständnis, deine stetige Unterstützung und deine bestärkenden Worte.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Mutter, meiner Schwester, meinen Großeltern, meiner restlichen Familie und meinen Freunden aus tiefem Herzen bedanken. Euer Rückhalt und eure liebevolle Unterstützung haben vielfach zur Bewältigung meines Veterinärmedizinstudiums und meiner Dissertation beigetragen.